Aus dem Institut für Anatomie II
der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall

Eine methodenkritische Studie zum histochemischen Nachweis der Apoptose mittels TUNEL im Hodengewebe der Wistarratte

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Anja Miedlich

2014

Als Inauguraldissertation

gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

Gez.: Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. Haider

Zweigutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Lorch

Meinen Eltern

Meinem Freund

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung		Seite 6
Liste der Abkürzungen		7
1.	**Einleitung**	8
1.1	Vorgang der Apoptose	8
1.1.1	Bcl-2-Familie	11
1.1.2	Fas-Rezeptor/Fas-Ligand	11
1.1.3	IAP	12
1.1.4	p53	12
1.1.5	Nekrose	13
1.2	Apoptose im Hodengewebe	14
1.3.	Morphologische Nachweismethoden der Apoptose	16
1.3.1	Elektronenmikroskopische Kriterien zur Feststellung der Apoptose	16
1.3.2	Immunhistochemie	16
1.3.3	TUNEL-Methode	17
1.4	Fragestellung	17
2.	**Material und Methoden**	19
2.1	Wistarratten	19
2.1.1	Organentnahmen	19
2.2	Methoden der Fixierungen	20
2.2.1	Begründung der Fixierungen	20
2.2.1.1	Bouin	20
2.2.1.2	Paraformaldehyd	20
2.2.1.3	PLP-Lösung	21
2.2.2	Herstellung der Fixierungen	21
2.2.2.1	Bouin	21
2.2.2.2	Paraformaldehyd	21
2.2.2.3	PLP-Lösung	21
2.3.	Einbettung und Schneiden	22
2.4	TUNEL-Methode	23
2.5	Hämalaun	26
2.6	PJS	26
2.7.	Auswertung	27

3. Ergebnisse 30

3.1 Befunde nach der Fixierung mit der Lösung Bouin 30

3.2 Befunde nach der Fixierung mit der Lösung PLP 36

3.3 Befunde nach der Fixierung mit der Lösung Paraformaldehyd 40

3.4 Befunde über die Zellzählung: ein Vergleich der drei Fixierungsmethoden 42

3.4.1 Tubuli seminiferi 42

3.4.2 Interstitielle Zellen 45

4. Diskussion 48

4.1 Die TUNEL-Methode 48

4.2 Interpretation und Diskussion der Ergebnisse 54

4.3 Schlussfolgerungen 57

4.4 Ausblick 58

5. Literaturangaben 60

Danksagung 69

Eidesstattliche Erklärung 70

Lebenslauf 71

Zusammenfassung

***Titel*: Eine methodenkritische Studie zum histochemischen Nachweis der Apoptose mittels TUNEL im Hodengewebe der Wistarratte**

Ziel: Ziel dieser Arbeit war es, eine kritische Studie über die Aussagefähigkeit der TUNEL-Methode anzufertigen um im Weiteren eine Empfehlung über den Grad der Effektivität dieser Methode und über die Apoptose-Darstellungsmöglichkeiten in Hodengewebe der Wistarratte zu formulieren. Schwerpunktmäßige soll hier der Einfluss der drei verschiedenen Fixierungen (Bouin, Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd, Paraformaldehyd) auf die Qualität der Befunderhebung bei der TUNEL-Methode untersucht werden.

Material und Methoden: Es wurden Wistarratten der Alterstufen 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 100 pnd sowie zwei Jahre alte Tiere verwendet. Die Hoden wurden in Bouin'scher Lösung, Paraformaldehyd-Lösung und PLP-Lösung fixiert. Die Apoptose sollte mittels TUNEL nachgewiesen werden. Zur besseren morphologischen Darstellung der testikulären Strukturen wurde ergänzend mit Hämalaun und PJS gefärbt. In den Negativkontrollen wurde die Enzymlösung durch Labellösung ersetzt. Es erfolgte eine lichtmikroskopische Auszählung aller positiven Reaktionen der tubulären und interstitiellen Zellen.

Befunde: Die Befunde nach der Fixierung mit Bouin weisen bei guter morphologischer Qualität der Schnitte neben spezifischen nukleären Anfärbungen apoptotischer Zellen auch scheinbar unspezifische plasmatische Reaktionen der tubulären und interstitiellen Zellen auf. PLP-fixierte Präparate zeigen bei einer zufriedenstellenden Morphologie auch ein sicher reproduzierbares Färbeverhalten. Die apoptotischen Zellkerne weisen die gewünschte positive nukleäre Reaktion auf. Plasmatische oder interstitielle Farbreaktionen finden sich nicht. Ein ähnliches Färbeverhalten findet sich auch in den Paraformaldehyd-fixierten Präparaten. Jedoch ist die morphologische Qualität der Schnitte deutlich schlechter als in den beiden anderen Fixierungen. Es kommt zu ausgeprägten Schrumpfungsartefakten sowohl der Tubuli als auch der Zellen selbst. Nebenbefundlich fielen in allen drei Fixierungen auch Zellen in der Zellteilung mit positiven nukleären Reaktionen auf.

Schlussfolgerungen:

1. Die TUNEL-Methode sollte nicht als einzige Methode oder als Hauptmethode zum Nachweis der Apoptose in morphologischen Untersuchungen verwendet werden. Die Anwendung der TUNEL-Methode kann somit nur als ergänzendes Nachweisverfahren in Betracht gezogen werden.

2. Die Auswahl der Fixierungsmethode ist maßgebend für die Befunderhebung. Dies bedeutet auch, dass die Befunde aus einer Studie nicht auf eine andere Studie übertragen werden können. Dieser Aspekt kann die Anwendbarkeit der TUNEL-Methode erheblich einschränken.

3. Der gemeinsame Befund in allen drei Fixierungen über die Anzahl der nukleären Reaktionen in den Zellen der Tubuli seminiferi zwischen dem 15. und 35. Postnataltag deutet auf eine gesteigerte Apoptose dieser Zellen in der postnatalen Phase hin. Darüber hinaus erlauben die Befunde keine weitere Feststellung zur altersabhängigen Änderung im Apoptoseverhalten der testikulären Zellen.

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIF	apoptosis inhibiting factor – apoptosehemmender Faktor
ALC	adulte Leydig Zellen
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl	Onkoproteine aus der B-Zell-Lymphom-Reihe
BAK	Protein im Endoplasmatischen Retikulum
BAX	mitochondriales Protein
Converter POD	Antifloureszenz-Antikörper
DAB	Diaminobenzidin
DD	Todesdomäne
DePeX	Eigenname für Präparat zum Eindecken der Schnitte
DISC	death inducing signaling complex – Apoptose induzierender Komplex
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fab-Fragmente	Teile von Immunglobulinen
FADD	Fas associated death domain – Fas-assoziierte Todesdomäne
Fas	membranständiger Rezeptor
FLC	fetale Leydig Zellen
FLIP	Fas-linked inhibiting protein – Fas-gebundenes hemmendes Protein
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HGF	Hepatocyten-Wachstumsfaktor
IAP	inhibitor of apoptosis protein – Apoptose hemmendes Protein
mRNA	mitochondriale Ribonucleinsäure
PBS	Phosphat buffered Saline
PJS	Perjodsäure-Schiffsreagenz
PLP	Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd
pnd	postnataler Tag
PTP	Permeabilität mitochondrialer Poren
RNA	Ribonukleinsäure
SMAC	small mitochondrial activator of apoptosis – kleiner mitochondrialer Aktivator der Apoptose
SOD	silencer of death domain – Teil der Todesdomäne
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TVA	Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf

1. Einleitung

1.1 Vorgang der Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des Zelltodes mit einem programmierten Zelluntergang. Sie tritt physiologisch auf, ist aber auch in die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie die Tumorentstehung oder neurodegenerative Prozesse, wie zum Beispiel die Alzheimer Erkrankung, in Form von Fehlregulationen involviert (Strasser et al. 2000).

Physiologisch tritt Apoptose (wörtlich „herabfallen“ der Zellfragmente) bei Differenzierungsprozessen in der Embryonal- und Fetalentwicklung auf. Sie ist durch selektive Eliminierung maßgeblich an der Organentwicklung beteiligt (Furtwangler et al. 1985). Zudem spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung des Gleichgewichtes von Zellproliferation und dem Untergang von Zellen, wie zum Beispiel bei den zellulären Blutbestandteilen (Golstein et al. 1991). Auch immunologisch kommen apoptotische Prozesse zum Tragen, bei der Elimination von infizierten oder geschädigten Zellen, die eine Veränderung der DNA aufweisen (Li et al. 2013). Saraste (1999) schätzte die Dauer der Apoptose an Herzmuskelzellen auf ca. 12 bis 24 Stunden, wobei sich morphologisch nachweisbare Veränderungen bereits binnen von ca. 2 Stunden einstellten.

Die Apoptose wird im Rahmen von Involutionen genetisch gesteuert und kann auch hormonabhängig ablaufen, wie zum Beispiel beim Menstruationszyklus. Wachstumsfaktoren hemmen diesen Prozess, Nekrosefaktoren und einige Hormone induzieren ihn (Gao et al. 2003, Hikim et Swerdloff 1999). Auch äußere Einflüsse wie Tageslichtdauer, Sauerstoffmangel, Paarungszeiten, Stoffwechsellage, Stress oder Umgebungstemperatur spielen eine Rolle (Blottner et al. 1999, Bustamente-Marin et al. 201 2, Erkkilä et al. 2006, Erkkilä et al. 2003, Ozawa et al. 2002, Vera et al. 2004, Young et al. 2001). Die Apoptose kann aber auch medikamentös induziert werden wie zum Beispiel in der Onkologie, wo ein programmierter Zelluntergang der Tumorzellen gezielt herbeigeführt wird

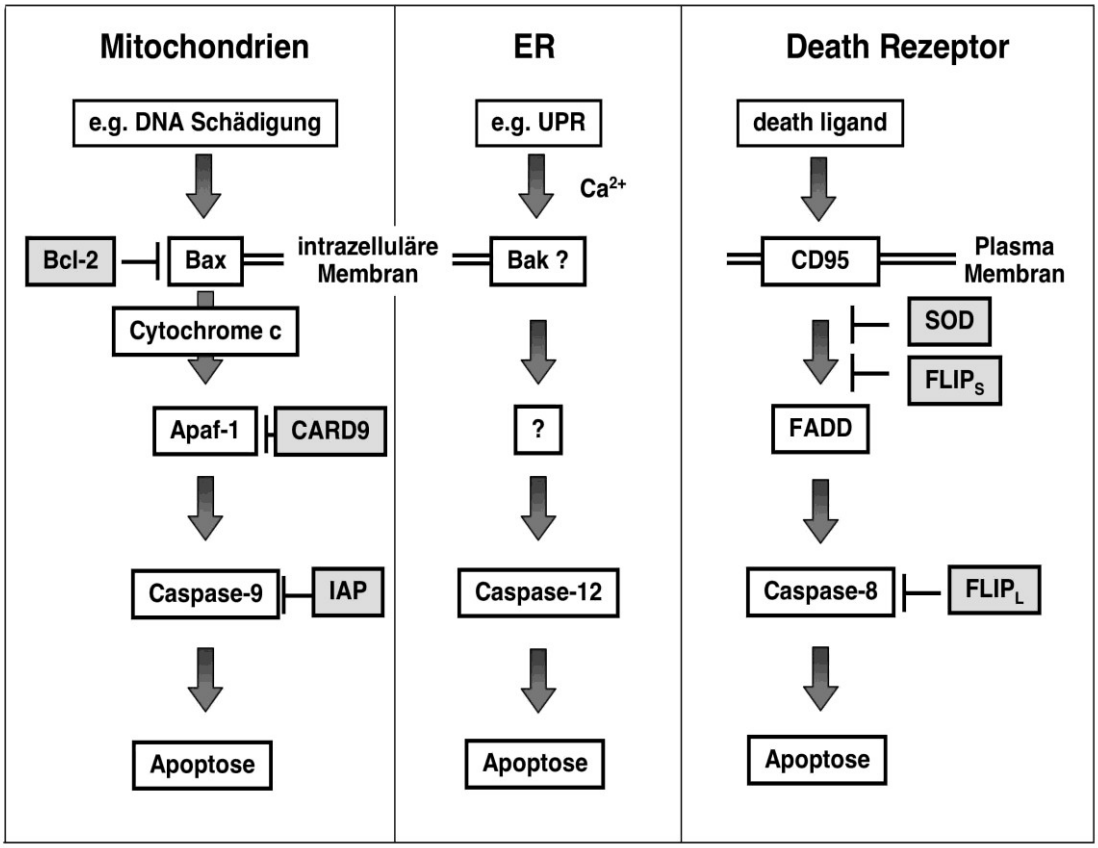
(Sukhotnik et al. 2013). Ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung von anderen Abbauprozessen ist das Ausbleiben einer lokalen Entzündungsreaktion. Die Apoptose kann über zytoplasmatische Wege aber auch rezeptorvermittelt ausgelöst werden. Die Abbildung 1 gibt einen schematischen Überblick über die Apoptosesignalwege und den beteiligten Zellstrukturen. Hierbei sind in erster Linie die Mitochondrien (Kroemer et Reed 2000) und das endoplasmatische Retikulum (Rudner et al. 2002) zu nennen. Auch die TNF-Rezeptoren-Familie ist in Form von Todesrezeptoren involviert (Celik et al. 2013, Daniel et al. 2001, de Vries et al. 2006).

Eine Möglichkeit der mitochondrialen Apoptoseinduktion ist die Gruppierung von Mitochondrien um den Zellkern herum. Durch BAX, ein mitochondriales Protein, erfolgt ein Einstrom von Zytosol und Elektrolyten, wodurch es zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials kommt. Hierbei kommt es zu einer Komplexbildung aus Cytochrom c, Procaspase 9, ASP und APAF-1, wodurch die Procaspase zur aktivierten Caspase 9 gespalten wird. Dadurch werden mittels limitierter Proteolyse sogenannte Effektorcaspasen aktiviert. Hier sind insbesondere Caspase-3, -6 und -7 zu nennen. Im weiteren Verlauf wird die Zellmembran fragmentiert. Die Atmungskette bricht zusammen, wodurch der Energiestoffwechsel zum Erliegen kommt und die Mitochondrien und in Folge auch die gesamte Zelle zerstört wird (Kroemer et Reed 2000, Strasser et al. 2000).

Zudem können Mitochondrien noch andere Faktoren freisetzen, die zur Apoptose führen. Dazu zählen die Caspase-Aktivatoren SMAC (small mitochondrial activator of apoptosis), heat-shock-Proteine, Endonukleasen, und AIF (apoptosis inducing factor).

Weitere Möglichkeiten der Initiierung von Apoptose über die Mitochondrien werden über die Bcl-2-Familie vermittelt.

Abbildung 1: Apoptosesignalwege (nach Daniel et al., 2003)



Anmerkung: **Mitochondrien:** Die Aktivierung von Bax führt zur Bildung eines Apoptose induzierenden Signalkomplexes (DISC death inducing signaling complex) und zur Aktivierung von Initiatorcaspasen, Caspase-9. **ER (Endoplasmatisches Retikulum):** Bak ist im ER lokalisiert und kann bei ER-Stress (UPR, unfolded protein response) Apoptose induzieren. **Death Receptor (Todesrezeptor):** Der durch den entsprechenden Liganden aktivierte Todes-Rezeptor (Death-Receptor) induziert einen zytosolischen DISC aus Adapterproteinen, z.B. FADD und Procaspase-8, die Apoptose auslösen. Die Signalwege können durch verschiedene Inhibitoren gehemmt werden: durch Bcl-2, CARD-9 Caspaserekrutierungsdomäne 9, SOD silencer of death domain, $FLIP_S$ kurze Spleissvariante von Fas-linked inhibitory protein, FADD Fas-associated death domain, IAP inhibitor of apoptosis protein und $FLIP_L$ lange Spleissvariante von Fas-linked inhibitory protein.

1.1.1 Bcl-2-Familie

Bei den Proteinen der Bcl-2-Familie handelt es sich um Onkoproteine, die dem B-Zell-Lymphom entstammen und entsprechend ihrer Funktionen und Domänenstrukturen in 3 Gruppen eingeteilt werden können. Einige haben isoliert eine rein anti-apoptotische Wirkung, wie zum Beispiel Bcl-2 und Bcl-x. So ist beispielsweise die Wirkung von Bcl-2 abhängig von dem Verhältnis der Bcl-2/Bcl-2-Homodimeren zu Bcl-2/BAX-Heterodimeren (McDonell et al. 1996). Sie können aber auch, wenn sie in bestimmten Komplexen auftreten, diese induzieren. Daniel et al. (2003) zeigten, dass Bcl-2/Bcl-X die Apoptose induzieren kann. Bcl-2 kann an Proteine binden, die aus mitochondrialem BAX und BAK aus dem endoplasmatischen Reticulum Komplexe bilden, die zu einer Freisetzung von Cytochrom C und ATP in das Zellplasma führen, wodurch der Energiestoffwechsel der Zelle empfindlich gestört wird (Jürgensmeier et al. 1998). Durch Bcl-2 kann dies wiederrum gehemmt werden (Yang et al. 1997). Dass BAX für die Apoptose im Hoden ebenfalls eine Rolle spielt, zeigten Russell et al. (2002) sowie de Rooij (2001).

1.1.2 Fas-Rezeptor/Fas-Ligand

Eine andere Möglichkeit den Zelluntergang einzuleiten, führt über bestimmte membranständige Liganden-Rezeptor-Komplexe, die auch als Todesliganden und Todesrezeptoren bezeichnet werden. Die Nomenklatur ist etwas unübersichtlich, da die Entdeckung von identischen Substanzen, die das Wachstum von Tumoren hemmen, zeitgleich auf verschiedenen Kontinenten erfolgte. Somit existieren neben FAS noch die Bezeichnungen APO 1 und als internationaler Namen CD95.

Die Rezeptoren der TNF-Familie sind membranständige Rezeptoren mit extrazellulären Domänen. Der Ligand befindet sich extrazellulär und bindet an einen dreiteiligen membranständigen Rezeptor. Der intrazelluläre Teil ist für die Initiierung der apoptischen Abbauprozesse verantwortlich, wie Itoh et Nagata (1993) sowie Tartaglia et al. (1993) zeigen konnten. Nagata et Golstein (1995) bestätigten, dass dies zur Aktivierung von Tumor-Nekrose-Faktor Alpha führt,

wodurch weitere Proteinasen aktiviert werden, die die Apoptose bedingen. Am Hoden konnte dies durch Celik et al. (2013) nachgewiesen werden.

Bei Ligandenbindung wird eine Trimerisierung des Rezeptor initiiert, so dass der intrazelluläre Teil mit der sogenannten Todesdomäne (DD - Death domain), welche Signalkaskaden in Gang setzt, die zur Apoptose führen, aktiviert wird. Hierbei kommt es zu einer Rekrutierung von Adapterproteinen, zum Beispiel von FADD (Fas associated death domain) im TNF-R1- und CD/95-Fas-Signalweg. Die Adapterproteine werden von Caspasen, sogenannten Initiator- oder Procaspasen, zu aktiven Caspasen gespalten. Der Hauptvertreter der aktivierten Caspasen im CD95/Fas-Signalweg und im TNF-1-Rezeptorvermittelten Zellabbau ist Caspase 8. Aktuell sind als Todesrezepteren der TNF-Rezeptor (TNF-R1), CD95/Fas, TRAIL-Rezeptor DR3 und DR 6 sowie die TRAIL-Rezeptoren 4 und 5 bekannt.

Zudem gibt es eine Reihe von Proteinen, die regulatorisch in den programmierten Zelluntergang eingreifen oder diesen auch initiieren können, wie die Inhibitoren der apoptotischen Proteine oder p53.

1.1.3 IAP

IAP sind Inhibitoren der apoptotischen Proteine, die aktivierte Caspasen hemmen können und somit als Regulatoren der Apoptose einzuordnen sind (Takahashi et al. 1998, Salvesen et Duckett 2002). Sie entstammen dem Baculovirus und verfügen über verschieden funktionelle Einheiten, wodurch sie spezifische verschiedene Caspasen inhibieren können (Srinivasula et al. 2001). Caspase 9 wird durch BIR 3 und Caspase 3 und 7 werden durch BIR 2 gehemmt (Srinivasula et al. 2001, Verhagen et al. 2000).

1.1.4 p53

P53 ist ein Protein, welches physiologische Prozesse, wie die Zellproliferation, steuert. Es ist in der Lage sequenzspezifisch an doppelsträngige DNA zu binden und somit die Replikation und Transkription zu regulieren (Donehewer et Bradley 1993). Werden im Rahmen dieser Prüfprozesse Schäden oder Fehler festgestellt,

steigt der intrazelluläre p53-Spiegel und es kommt zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase, so dass ein Übertritt in die S-Phase nicht möglich ist und der Schaden repariert werden kann. Sollte dieser irreparabel sein, wird der Zelluntergang eingeleitet. Vaseva et al. (2012) zeigten an Hirnpräparaten, dass p53 aber auch in Nekrose-Prozesse eingebunden ist. Als Sensor für oxidativen Stress kommt es im Rahmen von Ischämien zu einem Anstieg der p53-Konzentration in den Mitochondrien und zu einer erhöhten Permeabilität der mitochondrialen Poren (PTP) und zur Komplex-Bildung mit Cyclophorin D. Diese p53-CypD-Komplexe lassen sich besonders in ischämischen Präparaten nachweisen und werden als Indikator für durch oxidativen Stress induzierte Nekrose interpretiert.

Gemeinsam ist allen Wegen die gleiche Endstrecke: Aktivierte Effektorcaspasen -3, -6 und -7 aktivieren weitere Proteasen wie Calpaine und Kathepsine, die zur Zerstörung des Zytoskeletts führen. Außerdem werden die Membran des Zellkerns und weitere Zellorganellen abgebaut. Es kondensiert das Heterochromatin zu großen Schollen (Mikronuclei). Da die Mitochondrien in diese Kaskaden eingebunden sind und ebenfalls zu Grunde gehen, bricht der Energie-Stoffwechsel der Zellen zusammen, sie schrumpfen und es werden Zytoplasmafragmente abgetrennt, sogenannte apoptotische Körper, welche im weiteren Verlauf von Gewebsmakrophagen phagozytiert werden. Diese werden durch Oberflächenmarker wie Phosphatidylseringruppen und Lipidbotenstoffe aktiviert (Lauber et al. 2003).

1.1.5 Nekrose

Die Apoptose ist abzugrenzen von einer Nekrose, die auf eine nicht zu reparierende exogene Schädigung zurückzuführen ist und durch folgende Abbauprozesse charakterisiert wird: Zellschwellung, Denaturierung der zytoplasmatischen Proteine, Zerstörung der Zellorganellen und Veränderung der nukleären Morphologie auf Grund eines unspezifischem Abbaus der Erbgutinformationen. Morphologisch zeigt sich initial eine verstärkte Basophilie, die im Verlauf durch Abbau der plasmatischen Strukturen in eine ausgeprägte Eosinophilie übergeht. Nekrotische Abbauprozesse führen zu einer

Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes mit Einwanderung von Lymphozyten und Makrophagen.

1.2 Apoptose im Hodengewebe

In der Literatur ist der Vorgang der Apoptose im Hodengewebe in zwei Zelltypen eindeutig nachgewiesen: erstens in Spermatogenese-Zellen, insbesondere in den Spermatogonien und Spermatozyten und zweitens in den Leydig-Zellen (Assinder et al. 2007, Morales et al. 2007).

Leydig-Zellen sind hormonproduzierende Zellen des Interstitiums, die sich teils in Clustern teil singulär zwischen den Tubuli seminiferi befinden. Laut Haider et al. (1983) sind die FLC nach dem 25 pnd lichtmikroskopisch nicht mehr nachzuweisen. Demgegenüber stehen die adulten Leydig-Zellen (ALC), die sich aus peritubulären und perivaskulären Fibroblasten entwickeln (Haider 2004, Haider et al. 1995, Mendis-Handagama et Ariyaratne 2001). Etwa ab dem 35. postnatalen Tag produzieren die adulten Leydig-Zellen Testosteron. Sie sind groß, azidophil und haben einen hellen rundlichen Zellkern.

Es ist wiederholt nachgewiesen worden, dass zwischen dem 15 und 25 Postnataltag (pnd) ein signifikanter Rückgang der FLC zu verzeichnen ist (Haider et al. 1986). Die Ursache dieses Prozesses und die genauen Abläufe sind nach wie vor unklar. Auch Morales et al. (2007) zeigte, dass zwischen dem 14 und 20 pnd eine deutlicher Anstieg von apoptotischen Zellen zu beobachten ist, begleitet von einer geöffneten Blut-Hoden-Schranke. Ob diesbezüglich ein kausaler Zusammenhang besteht, ist ungeklärt. Die Arbeitsgruppen um Kerr und Knell (1988) sowie um Ariyaratne et al. (2000) sind hingegen der Meinung, dass die FLC weiterhin existieren und an der Produktion der steroidalen Hormone beteiligt sind.

Zudem kann Apoptose von Keimzellen auch durch Hormone wie zum Beispiel Östrogene ausgelöst werden, wie Assinder et al. (2007) und Simoes et al. (2013)

zeigten. Del Bravo et al. (2007) sowie Ricci et al. (2012) bestätigten eine modulierende Rolle des HGF (hepatocyte growth factor) auf die Apoptose bzw. Differenzierungsvorgänge in fetalen Leydig Zellen der Maus. Auch die Blockade von Hormonen kann Apoptose auslösen, wie Yao et al. (2012) zeigten. Sie wiesen nach, dass FSH-Autoantikörper ebenfalls zu einem Anstieg von Apoptose in Keimzellen führen. Ruwanpura et al. (2008) bestätigten dies und stellten eine gesteigerte Keimzellapoptose in Zusammenhang mit einer unterdrückten FSH-Freisetzung fest. Olaso et al. (1998) wiesen unter anderem den Einfluss von TGF auf die Apoptose im Hoden nach.

Auch Temperaturerhöhungen können in Rattenhoden zu einer Steigerung der Apoptose führen. Dies konnten Hikim et al. (2003) über einen Anstieg der Caspasen 9, 3, 6 und 7 nachweisen. Weiterhin stellte die Gruppe fest, dass der Todesrezeptorweg über die Fas-Liganden/Fas-Rezeptoren durch eine erhöhte Temperatur nicht aktiviert wurde. Die Gruppe um Young und Nelson (2001) zeigte an Nerzen, dass auch eine Abnahme der Tageslichtdauer zu einem signifikanten Anstieg des programmierten Zelltodes führt. Young et al. (2001) bestätigten dies an Mäusen. Eine saisonale Abhängigkeit konnten Blottner et al. (1999) nachweisen. Dass eine Aktivierung der Caspase 3 für die Apoptose im Hodengewebe notwendig ist, bestätigten Kim et al. (2000).

Die Datenlage bezüglich des testikulären Vorkommens von Bcl-2 ist zum Teil sehr widersprüchlich. Rodriguez et al. (1997) fanden in Mäusen kein Bcl-2. Woolveridge et al. (1999) hingegen konnten in Keimzellen einen Anstieg von Bcl-2 bei Testosteronmangel feststellen.

Auch bezüglich der Todesrezeptoren sind die Befunde sehr heterogen. So befinden sich im Hoden von Mäusen die Fas-Rezeptoren in den Keimzellen und die Sertoli-Zellen verfügen über den Fas-Liganden (Lee et al. 1997, Pentikainen et al. 1999). In Ratten konnte eine derartige räumliche Separation nicht nachgewiesen werden. Hier verfügen sowohl die Sertoli-Zellen als auch die Spermatiden und pachytänen Spermatozyten über Fas-Liganden und Fas-Rezeptoren (Woolveridge et al. 1999).

Rotter et al. (1993) zeigten, dass sich im Rahmen der Apoptose in Hodengewebe p53 als p53mRNA besonders in Spermatiden und Spermatocyten findet. Die Spermatogonien verfügen über das isolierte Protein p53.

1.3 Morphologische Nachweismethoden der Apoptose

1.3.1 Elektronenmikroskopische Kriterien zur Feststellung der Apoptose

Zu den elektronenmikroskopischen Merkmalen der Apoptose gehören neben der zytoplasmatischen Kondensation auch die Verdichtung des Chromatins. Ebenso können die sich abschnürenden Membranausstülpungen (Blebbing) und die daraus resultierenden Vesikel sehr gut dargestellt und untersucht werden. Weitere wichtige Kennzeichen der Apoptose sind: starke Kondensierung zur Präzipitierung des Chromatins an der Kernmembran, Entstehung von membranbegrenzten Zellfragmenten (= Aptoptosekörper = „ apoptotic bodies“) (Lüllmann-Rauch, 2006).

1.3.2 Immunhistochemie

Für den visualisierten Nachweis von Apoptose steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung, wie zum Beispiel Immunhistochemie. Hierzu gibt es eine Reihe von Nachweissets, die spezifisch einzelne in die Apoptose involvierte Proteine wie Bcl-2, BAX oder zahlreiche Caspasen aber auch DNA-Fragmente nachweisen können. Der Nachweis von DNA-Fragmenten kann zum Beispiel über die TUNEL-Methode erfolgen.

1.3.3 TUNEL-Methode

Die TUNEL-Methode zählt zu den immunhistochemischen Nachweisverfahren des programmierten Zelltodes und wurde erstmals 1992 von Gavrieli et al. durchgeführt. Sie dient der Darstellung apoptotischer Zellkerne, wobei DNA-Fragmente farblich markiert werden. TUNEL steht für **T**dT(Terminal desoxynucleotidyl transferase)-mediated d**U**TP-biotin **N**ick **E**nd **L**abelling. Im Rahmen des programmierten Zelltodes wird der DNA-Strang fragmentiert und an den Bruchenden werden Hydroxylgruppen frei. Diese können mittels der terminalen Desoxynucliotid-Transferase mit markierten Nukleotiden versehen und anschließend mit diversen Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Die Auswertung kann je nach verwendetem Farbstoff mit dem Floureszenz- oder auch mit einem Lichtmikroskop erfolgen. In der hier dargestellten Versuchsreihe wurde ein lichtmikroskopischer Farbstoff gewählt, da die Ergebnisse eine größere Beständigkeit aufweisen.

Dass Fixierungen einen Einfluss auf die Aussagekraft von Nachweismethoden, insbesondere auch auf den Nachweis der Apoptose mit TUNEL haben, zeigte bereits die Gruppe um Paul Howroyd et al. (2005) an 19 Tage alten fetalen Rattenhoden. Auch Vorbehandlungen und einzelne Komponenten des Färbeprozesses beeinflussen die Ergebnisse.

1.4 Fragestellung

Der Vorgang der Apoptose ist derzeit Gegenstand intensiver biomedizinischer Forschung. Zudem gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten diese Prozesse in ihrem Ergebnis oder in Form der beteiligten Akteure sichtbar zu machen, sei es in Form von Enzymnachweisen, DNA-Fragmenten oder Proteinen. Eine häufig verwendete Methode zum Nachweis von DNA-Fragmenten ist die TUNEL-Methode. Ein entscheidender Faktor für reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse ist die Fixierung der Organe, da sie einen erheblichen Einfluss auf die Morphologie der zu untersuchenden Objekte und damit auf die Auswertbarkeit der Präparate hat.

Ziel dieser Arbeit war es, eine kritische Studie über die Aussagefähigkeit der TUNEL-Methode anzufertigen um im Weiteren eine Empfehlung über den Grad der Effektivität dieser Methode und über die Apoptose-Darstellungsmöglichkeiten in Hodengewebe der Wistarratte zu formulieren. Schwerpunktmäßige soll hier der Einfluss der drei verschiedenen Fixierungen (Bouin, Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd, Paraformaldehyd) auf die Qualität der Befunderhebung bei der TUNEL-Methode im Rattenhoden untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Wistarratten

Die männlichen Wistarratten wurden zwecks der Organentnahme bei der zentralen Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bestellt und abgeholt (**TVA-Aktenzeichen 021/88; Prof. Haider, Anatomisches Institut II, Heinrich Heine Universität Düsseldorf**). Die Tiere wurden entsprechend den gesetzlichen Vorgaben in der TVA der Düsseldorfer Heinrich-Heine-Universität gezüchtet. Die Tötung der Tiere und die Organentnahmen wurden von einer Fachkraft des Institutes für Anatomie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Doktorandin erhielt die beiden Hoden zur weiteren Bearbeitung.

Das Alter der Tiere betrug: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 100 Tage, sowie 2 Jahre alt. Bei den zweijährigen Tieren wurde auf bereits in Paraffin eingebettete Hoden aus Restbeständen des Labors des Instituts der Anatomie II der Düsseldorfer Universität zurückgegriffen. Da allerdings nur Bouin-fixierte Präparate der zweijährigen Tiere zur Verfügung standen und somit die PLP- und Paraformaldehyd-Fixierungen nicht vergleichend hinzugezogen werden konnten, wurden die Schnitte zwar mit gefärbt und ausgezählt, aber in die abschließende Auswertung nicht einbezogen. Auch die Präparate von 100 Tage alten Tieren, waren bereits als PLP- und Formaldehyd-fixierte in Paraffin eingebettete Blöcke im Institut vorrätig, so dass hierbei nur 3 Tiere für die Bouin-Fixierung benötigt wurden. Die Fixierungen sind gemäß den unten aufgeführten Protokollen erfolgt.

2.1.1 Organentnahmen

Für die Gewinnung der Hoden der Altersstufen 1 pnd bis 35 pnd wurden je 8 Ratten benötigt. Bei den 100 pnd alten Ratten wurden 3 Tiere am Tag der Präparation vormittags mit Ethylaether narkotisiert, getötet und gewogen. Es wurden umgehend beide Hoden präpariert und in die verschiedenen Fixierungen

überführt (je fünf Hoden pro Fixierung, der überzählige sechste wurde für weitere Untersuchungen innerhalb des Labors ebenfalls in Bouin fixiert). Es wurde besonders darauf geachtet, überschüssige Gewebe, Haare und Blutkoagel restlos zu entfernen, da sie beim Einbetten und Schneiden zu Problemen führen können.

2.2 Methoden der Fixierungen

Als abhängiger Faktor wurde die Fixierung gewählt, weil gerade im Hodengewebe erhebliche qualitative Unterschiede in der morphologischen Darstellung bei verschiedenen Fixierungen bestehen, was sich in den Vorversuchen auch bestätigte.

2.2.1 Begründung der Fixierungen

2.2.1.1 Bouin

Bouin ist eine in der Lichtmikroskopie häufig verwendete Fixierung. Es wird meist für Übersichtspräparate und im Rahmen von immunhistochemischen Untersuchungen gebraucht, da es neben Formalin auch Pikrinsäure enthält, die ein leichteres Eindringen des Formalins ermöglicht und somit eine bessere morphologische Qualität erzeugt. Zudem wird die Antigenität für Immunfixierungen, aber auch die Empfindlichkeit für das Anfärben im Allgemeinen besser erhalten. Da Pikrinsäure auskristallisiert, wenn sie älter wird, sollte die Lösung immer frisch zubereitet werden. Besonders im testikulären Gewebe erlaubt diese Fixierung eine sehr gute Beurteilung der Morphologie, insbesondere des Zellkerns.

2.2.1.2 Paraformaldehyd

Paraformaldehyd ist die kristalline Form des wasserlöslichen Gases Formaldehyd. Es ist in der Histologie ein Standardfixans, welches sowohl für die Licht- als auch für die Elektronenmikrokopie verwendet werden kann. Es ist sehr instabil,

weshalb es frisch zubereitet werden sollte. Paraformaldehyd dringt schnell in die Gewebe ein und erlaubt auf Grund der erhaltenen Enzymaktivitäten und Antigentät Ultrastrukturuntersuchungen, immunhistochemische Beurteilungen und Enzymnachweise. Die Gruppe um Sasso-Cerri et Miraglia (2002) erhielten mit dieser Fixierung in Kombination mit der TUNEL-Methode sicher reproduzierbare Ergebnisse ohne beeinträchtigende unspezifische Anfärbungen.

2.2.1.3 PLP

Perjodat-Lysin-Formaldehyd wird hauptsächlich in der Elektronenmikroskopie verwendet, da es bei immunhistochemischen Untersuchungen zudem eine gute Erhaltung der Morphologie ermöglicht. Auch in der Lichtmikroskopie kommen diese Eigenschaften zum Tragen. Bei unterschiedlichsten Markern und Färbeprozessen ist eine optimale Strukturerhaltung möglich.

2.2.2 Herstellung der Fixierungen

2.2.2.1 Bouin

Die Fixierlösung wurde frisch aus 75 ml 1,2%iger wässriger Pikrin-Lösung und 25 ml 37%ige Formaldehyd-Lösung sowie 5 ml Eisessig hergestellt.

2.2.2.2 Paraformaldehyd

Für die Herstellung des 8%igen Paraformaldehyds wurden 8 g Paraformaldehyd in 100 ml aqua bidest. unter Erhitzen auf 60 °C und ständigem Rühren gelöst. Anschließend wurde 1 M NaOH zugefügt bis die Lösung eine wasserklare Farbe annahm und somit der pH-Wert neutral eingestellt war.

2.2.2.3 PLP

Das Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd wurde aus zwei Lösungen hergestellt: die erste bestand aus 0,1 M Lysinmonohydrochlorid, welches in 50 ml 0,2 M NaH_2PO_4-Lösung gelöst wurde und mit aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt wurde. Für die

zweite Lösung (8%iges Paraformaldehyd) wurden 8 g Paraformaldehyd in 100 ml aqua bidest. unter permanentem Rühren bei 60 °C gelöst. Dem wurde tropfenweise 1 M NaOH zugegeben bis die Lösung völlig klar und somit pH-neutral war. Sie wurde abschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert.
Beide Lösungen wurden bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch in der benötigten Menge in folgenden Verhältnis gemischt: 7,5 ml der ersten Lösung mit 2,5 ml der zweiten Lösung und 21,4 g Natriumperjodat und abschließend mittels 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.3 Einbettung und Schneiden

Die Hoden wurden einzeln in die verschiedenen Fixierlösungen (Bouin, PLP, Paraformaldehyd) eingelegt. Die Altersgruppen 1 pnd und 5 pnd in 5 ml Fixierung, die Altersgruppen 10 pnd bis 30 pnd in 10 ml Fixierung und die weiteren Altersstufen in 50 ml. Die Gewebe verblieben 24 Stunden darin, wobei die Lösung währenddessen nach 12 Stunden gegen frisch zubereitete ersetzt wurde. Anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet. Hierbei durchliefen die Organe eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%) für je 12 Stunden zum Entwässern. Hierbei wurden die Lösungen ebenfalls einmal nach 6 Stunden ausgetauscht. Danach wurden die Hoden in Methylbenzoat überführt, welches in den ersten 24 Stunden zweimal nach jeweils 8 Stunden gewechselt wurde.
Bei den Hoden der 35 Tage alten Tiere sowie den 100-tägigen erfolgte eine Halbierung der Präparate um ein besseres Eindringen der Fixierungen zu ermöglichen. Aus demselben Grund wurden auch die Polkappen entfernt. Die zweijährigen Hoden waren bereits halbiert eingebettet worden.
Für die Einbettung in Paraffin wurden die Hoden insgesamt 20 Minuten (2 x 10 Minuten) in Toluol eingelegt und anschließend mit der zu schneidenden Fläche nach unten in flüssiges Paraffin von 60 °C eingebettet, um dann im Wasserbad abzukühlen und zu erstarren.
Die Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms in 5 µm dünne Präparate geschnitten. In einem Wasserbad von 40 °C wurden die Schnitte

geglättet und auf Objektträger aufgebracht, welche anschließend senkrecht auf einer Heizplatte bei 62 °C getrocknet wurden.
Es wurden Serienschnitte angefertigt, die wie folgt eingefärbt wurden: Schnitt-Nr. 01 PJS, Nr. 02 TUNEL, Nr. 03 TUNEL mit Hämalaun, Nr. 04 Negativkontrolle, die Nummern 05 – 15 wurden nicht gefärbt, Nr. 16 PJS, Nr. 17 TUNEL, Nr. 18 TUNEL mit Hämalaun, Nr. 19 Negativkontrolle, die Nummern 20 bis 30 wurden nicht gefärbt, Nr. 31 PJS, usw. Ziel dieses Färbeschemas war es, unterschiedliche Ebenen des Hodengewebes anzutreffen und somit zu vermeiden, dass ein- und dieselbe Zelle zweimal ausgewertet wurde.

2.4 TUNEL-Methode

Der Nachweis der DNA-Fragmente erfolgte nach einer modifizierten Form des Schemas im Beipackzettel der Firma Roche®, Basel. Die Vorversuche erfolgten gemäß dem empfohlenen Versuchsablauf für Paraffinschnitte des Beipackzettels der Firma Roche®. Die darin angeratene Vorbehandlung der Präparate mit einer Proteinase K führte nicht zu der erwünschten und angestrebten Stabilisierung der Nukleinsäuren und Membranen, sondern zu einer intensiven interstitiellen Braunfärbung und scheinbar unspezifischen Kernfärbung in allen Schnitten, so dass alternativ eine Vorbehandlung mit Zitrat-Puffer und Mikrowelle gewählt wurde, welche als Alternative im Protokoll angeboten wird. Ebenso wurde der empfohlene Verdünnungsfaktor der Enzymlösung nach Vorversuchsreihen auf 1:12 festgelegt, da sich hier eine akzeptable reproduzierbare Kombination aus nukleärer Färbung und Vermeidung der unspezifischen Hintergrundfärbung zeigte.

Die Schnitte wurden bei 60 °C für 20 Minuten erwärmt und in einem 10-minütigen Xylolbad, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 90%, 80%, 70% Ethanol für je 2 Minuten) entparaffiniert.
Anschließend wurden sie in aqua bidest. gespült um restliche Paraffinbestandteile zu entfernen. Dann wurden die Schnitte eine Minute in der Mikrowelle bei 750 W in einem 0,1 M Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 erwärmt und direkt mit aqua bidest. abgekühlt. Anschließend wurden sie dreimal à 5 Minuten mit einem

PBS–Puffer gewaschen. Die Ränder der Objektträger wurden abgetrocknet, so dass die TUNEL reaction mixture bzw. die Negativkontroll-Lösung zu je 60 µl aufgetragen werden konnte. Es folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C in einer dunklen, feuchten Kammer. Danach wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen um dann für 10 Minuten eine 3%ige H_2O_2-Lösung aufzutragen. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden auf jeden Schnitt 70 µl des Converter POD aufgetragen und bei 37 °C in einer dunklen feuchten Kammer 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen und 50 µl DAB-Substrat pro Schnitt aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte mit aqua bidest. gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol geführt. Die Schnitte, die zusätzlich mit Hämalaun gefärbt werden sollten, wurden für 5 Minuten darin eingelegt und anschließend 10 Minuten mit Leitungswasser gewässert. Auch sie durchliefen im Folgenden die aufsteigende Ethanolreihe und abschließend ein Xylol-Bad. Die gefärbten Schnitte wurden umgehend mit DePex eingedeckt und waagerecht getrocknet.
Im Ergebnis sollten die TUNEL-positiven Zellkerne braun und alle weiteren Zellkerne blau und die Plasmaräume und Interstitien ungefärbt sein.

Die Herstellung der TUNEL reaction mixture erfolgte mittels des Kits von Roche®. Dies umfasst die terminale Desoxynucleotidyl Transferase vom Kalbsthymus, die rekombinant mit E. coli (Enzym-Lösung) versetzt wurde und mittels einer Nukleotid-Mixtur (Label solution) aktiviert wird.
Es wurden bei jedem Färbevorgang 450 µl Label-Lösung und 50 µl der Enzymlösung frisch vermischt. Dem wurde in einem Verhältnis von 1:12 ein spezieller Puffer (pH 7,4) aus 30 mM TRIS/HCl, 140 mM Cacodylat und 1 mM Kobaltchlorid zugefügt. Der Puffer wurde einmalig hergestellt und für alle TUNEL-Färbungen verwendet. Die fertigen Lösungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers bei -18 °C gelagert und erst kurz vor Verwendung langsam auf Raumtemperatur erwärmt.
Für die Negativkontrollen wurde die Enzymlösung durch die Label-Lösung, einer Nukleotid-Mixtur, ersetzt. Im Zuge der Vorversuche wurde die Positivkontrolle

dadurch erzielt, dass die hier beschriebene Methode an Zellkulturen angewendet wurde, die nachweislich die Apoptose aufwiesen. Das Ergebnis war eine distinkte Immunreaktion.

Das Converter POD ist ein Antifloureszenz-Antikörper, der aus Fab-Fragmenten vom Schaf besteht, welche mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert wurden. Dies ist als gebrauchsfertige Lösung im Kit von Roche® enthalten.

Der 0,1 M Zitratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 besteht aus zwei Lösungen, die frisch gemischt werden. Es handelt sich um 1,0505 g Zitronensäure-Monohydrat, welches in 500 ml aqua bidest. gelöst wird und 2,9410 g Natriumzitrat, welches in einem Liter aqua bidest. gelöst wird. Anschließend werden 47,5 ml der ersten Lösung mit 207,5 ml der zweiten Lösung zu dem verwendeten Zitratpuffer zusammengefügt.

Der 0,1 M PBS (phosphat buffered Saline) wurde wie folgt hergestellt: Es wurden 9 g Natriumchlorid in einem Liter aqua bidest. gelöst. Darin wurden dann 13,61 g Kaliumdihydrogenphosphat gelöst. Weiterhin wurden erneut 9 g Natriumchlorid in einem Liter aqua bidest. gelöst, worin anschließend 17,8 g Dinatriumhydrogenphosphat gelöst wurden. Beide Lösungen wurden im Verhältnis 1:5 gemischt und mittels 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Das DAB-Substrat (Diaminobenzidin) wurde aus DAB-Tabletten der Firma Dako® gefertigt. Eine Tablette wurde in 10 ml 0,01 M TRIS-Puffer (pH-Wert 7,4) aufgelöst. Dies wurde in Einheiten von 2 ml aufgeteilt. Eine 2-ml-Einheit wurde direkt vor Gebrauch mit 15 µl frischem 3%igem H_2O_2 versetzt um das Diaminobenzidin zu aktivieren. Die restlichen wurden bei -18 °C tiefgekühlt gelagert und vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmt und mit H_2O_2 aktiviert.

2.5 Hämalaun-Färbung

Auch die Schnitte, die mit Hämalaun gefärbt werden sollten, durchliefen zur Entparaffinierung ein 10-minütiges Xylol-Bad und anschießend eine absteigende Ethanolreihe in gleicher Weise wie für die Anfärbung mit TUNEL.
Im Weiteren verbleiben sie 8 Minuten im Hämalaun und wurden dann unter fließendem Leitungswasser gespült um zu Bläuen. Dann durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Ethanolreihe, wobei die Schnitte jeweils kurz in 70, 80, 90, 95 und 100%igen Ethanol getaucht wurden, gefolgt von zweimal 2 Minuten Xylol um abschließend mittels DePeX eingedeckt zu werden.
Durch diese Färbung werden die Zellkerne blau gefärbt.

Das Hämalaun wurde wie folgt hergestellt: 1 g Hämatoxylin wurde in 1000 ml aqua bidest. gelöst. Ebenso wurden 0,2 g Natriumjodat ($NaJO_3$) gelöst. Dem wurden 50 g Kalium-Aluminiumsulfat ($KAl(SO_4)_2$ x 12 H_2O) zugefügt, welches unter ständigem Rühren ebenfalls gelöst wurde und die Lösung im Verlauf eine tiefblaue Färbung aufweist.
Zudem wurden 50 g Chloralhydrat gelöst, dem 1 g Zitronensäure zugefügt wurde, wobei der Farbton ins Violette umschlägt. Vor Gebrauch wurden die Lösungen filtriert.

2.6 PJS-Färbung

Die Färbung PJS (Perjodsäure-Schiffsreagenz) wurde zur Identifizierung der Spermatogenese-Zellen durchgeführt. Zur Vorbereitung der Schnitte für die Färbung mit Perjodsäure erfolgte die Entparaffinierung synonym dem oben genannten Schema. Dann wurden sie mit aqua bidest. gespült und für 5 Minuten in Perjodsäure gebracht um dann wieder 1 Minute mit aqua bidest. gespült zu werden. Im Folgenden wurden sie 20 Minuten in Schiffsreagenz getaucht um anschließend direkt 2 Minuten SO_4-Wasser zu verbleiben. Abschließend wurden

die Schnitte 10 Minuten unter fließendem Wasser gespült um dann 2 Minuten mit Hämalaun gefärbt zu werden. Darauf folgte das Bläuen unter Leitungswasser für 5 Minuten um abschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert zu werden und mit DePeX eingedeckt zu werden.

Hierbei sollten sich die Zellkerne blau anfärben und Basalmembranen und Bindegewebe sollten in Magenta erscheinen.

2.7 Auswertung

Es erfolgte eine lichtmikroskopische Auswertung mittels eines Leitz-Mikroskops bei einer 25fachen Vergrößerung mit einem Zählgitter (Messstrichplatte der Firma Leitz®), welches 25 identische Kästchen à 4 mm^2(2mm x 2mm) umfasst und somit eine Gesamtfläche von 100 mm^2 abbildet.
Die Schnitte der Altersstufen 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 pnd wurden komplett ausgezählt. Bei den Präparaten der 100 Tage alten Tiere und der zweijährigen Tiere wurden je 70 Kästchen á 4 mm^2 ausgezählt, gemäß Abb. 2 und Abb.3.

Pro Altersstufe (1 bis 35 pnd) und pro Fixierung wurden je 5 Hoden verwendet. Für die 2 Jahre alten Tiere wurde auf die Bestände des Institutes zurückgegriffen. Die PLP und Paraformldehyd-fixierten Präparate der 100 pnd Tiere wurden frisch hergestellt. Bei den 100-tägigen Bouin-fixierten Präparaten wurden ebenfalls Restbestände des Institutes genutzt.
Es wurden pro Hoden je 40 Schnitte angefertigt, die nach oben genanntem Schema eingefärbt wurden. Somit ergaben sich je Hoden *drei Färbeserien (PJS, TUNEL, TUNEL + Hämalaun sowie TUNEL Negativkontrollen).*
Für die Auswertung wurde die Anzahl der ausgezählten, quer angeschnittenen Tubuli registriert ebenso wie die tubulär nukleär positiven Zellen und tubulär plasmatisch positiven Zellen. Randständige und schräg angeschnittene Tubuli wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen, da sie artefizielle positive Reaktionen aufweisen können.
Bei den 100 Tage alten Präparaten sowie den 2 Jahre alten Hoden wurden zudem

die Spermatogenesestadien der positiven tubulären Zellen berücksichtigt. Als Orientierung dienten hierfür eine Übersicht über die „stages and transitions in the cycle of the seminiferous epithelium“ der Ratte von Hess (1990) sowie die Arbeit von Suter et al. (1997). Die interstitiell positiven Zellen wurden nach Fibroblasten und Leydig Zellen/Makrophagen sowie nach nukleär und plasmatisch positiven Reaktionen quantitativ unterteilt. Weiterhin wurden in allen Altersstufen die positiv dargestellten Zellen in der Zellteilung mit Angabe des Stadiums festgehalten.

Bei den Altersstufen 1 bis 35 pnd erfolgte eine exakte quantitative Bestimmung der positiven Zellen, deren Anzahl anschließend auf die Fläche (Anzahl der ausgezählten Kästchen) bezogen wurde. Bei den Altersstufen 100 pnd wurden die Anzahl der positiven Zellen auf eine Fläche von 70 Kästchen ausgezählt und auf die Gesamtfläche hochgerechnet. In beiden Fällen ergibt sich ein Mittelwert der positiven Zellen pro mm^2 mit einfacher +/- Standardabweichung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in die folgenden Diagramme lediglich der Mittelwert übernommen. Die einfache positive und negative Standardabweichung wird gesondert in einer Tabelle aufgeführt.

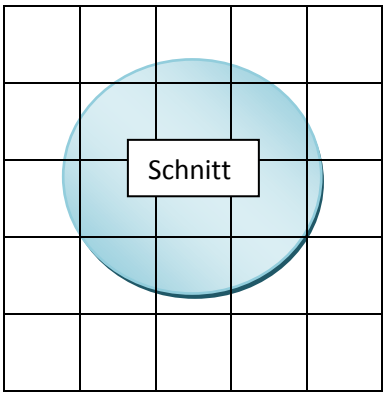


Abb. 2 schematische Darstellung der Auszählung in den Altersstufen **1 pnd bis 35 pnd** im Raster

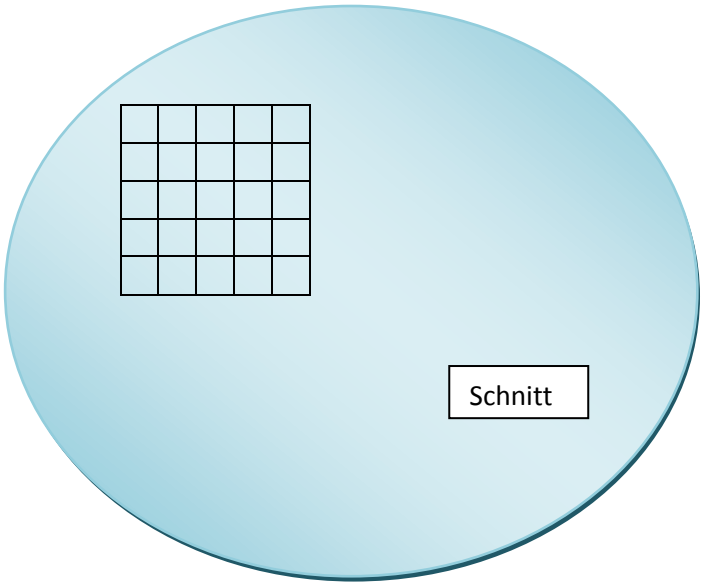


Abb. 3 schematische Darstellung der Auszählung der Schnitte in den Altersstufen **100 pnd und 2 Jahre**

3. Ergebnisse

3.1 Befunde nach der Fixierung mit der Lösung Bouin

Die Bouin-fixierten Präparate weisen eine gute morphologische Qualität auf, wie insbesondere die Untersuchungen der mit PJS gefärbten Schnitte zeigen. Diese morphologische Qualität beinhaltet neben der Erhaltung der Zell- und Kernform, die Intaktheit des Gewebeverbandes ohne künstliche Schrumpfungsräume zwischen den einzelnen Zellen bzw. innerhalb des Zellverbandes. Die Färbungen mit TUNEL allein lassen die apoptotischen Zellkerne gut erkennen, jedoch fällt die Abgrenzung des umgebenden Gewebes schwer, wie Abb. 4 zeigt. Die Interstitien sind nur andeutungsweise zu erkennen und lassen so keine weiteren Aussagen zu.

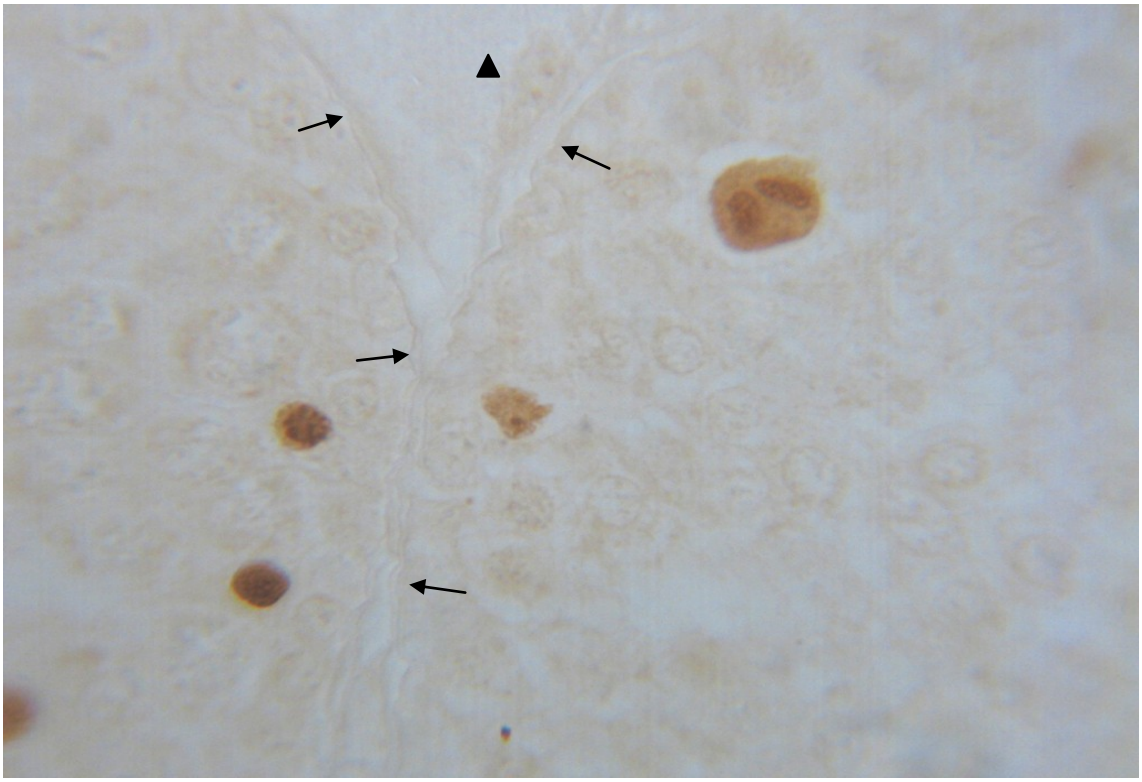


Abb. 4: Rattenhoden, **35 pnd**, Paraffinschnitt, **Fixierung: Bouin, TUNEL**, Endvergrößerung: 2000x. 1 cm der Abbildung entspricht 5 µm des Gewebes.

positiv gefärbte apoptotische Zellkerne (braun - im rechten Tubulus ein später Spermatozyt, im linken Tubulus zwei frühe Spermatozyten) mit unscharf abzugrenzender Umgebung, Pfeile weisen auf Basalmembran der angeschnittenen Tubuli. Dicker Pfeilkopf weist auf eine interstitielle Zellgruppe hin.

Deswegen wurde zur besseren Darstellung eine Kernfärbung mit Hämalaun ergänzt, die eine bessere Abgrenzung der Tubuli und Interstitien ermöglichte (Abb. 5 + 6).

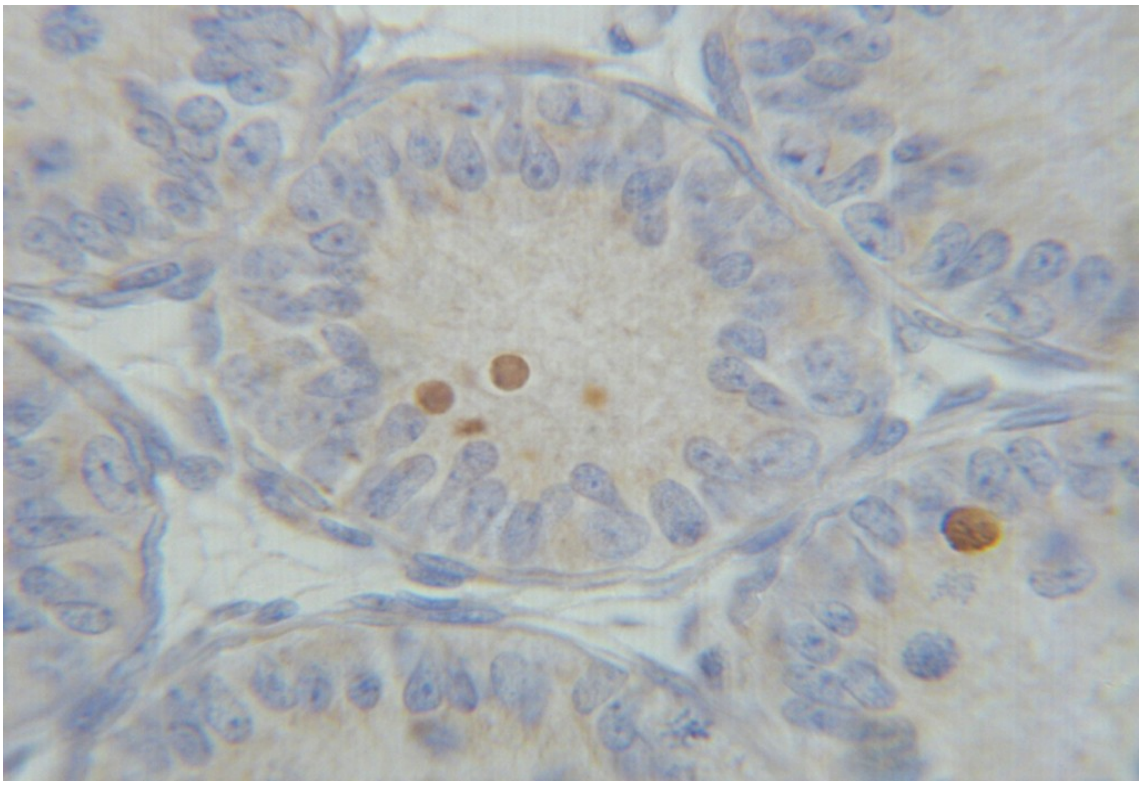


Abb. 5: Rattenhoden, **15 pnd**, Paraffinschnitt, **Bouin, TUNEL und Hämalaun**. Endvergrößerung: 2000x. 1 cm der Abbildung entspricht 5 µm des Gewebes.

Apoptotische Zellkerne braun – der rechts untere ist ein früher Spermatozyt.

Es fällt auf, dass in Bouin-fixierten Schnitten, die mit TUNEL und Hämalaun gefärbt wurden auch Zellen positiv nukleäre Reaktionen aufweisen, die Mitosefiguren enthalten. (Abb. 6)

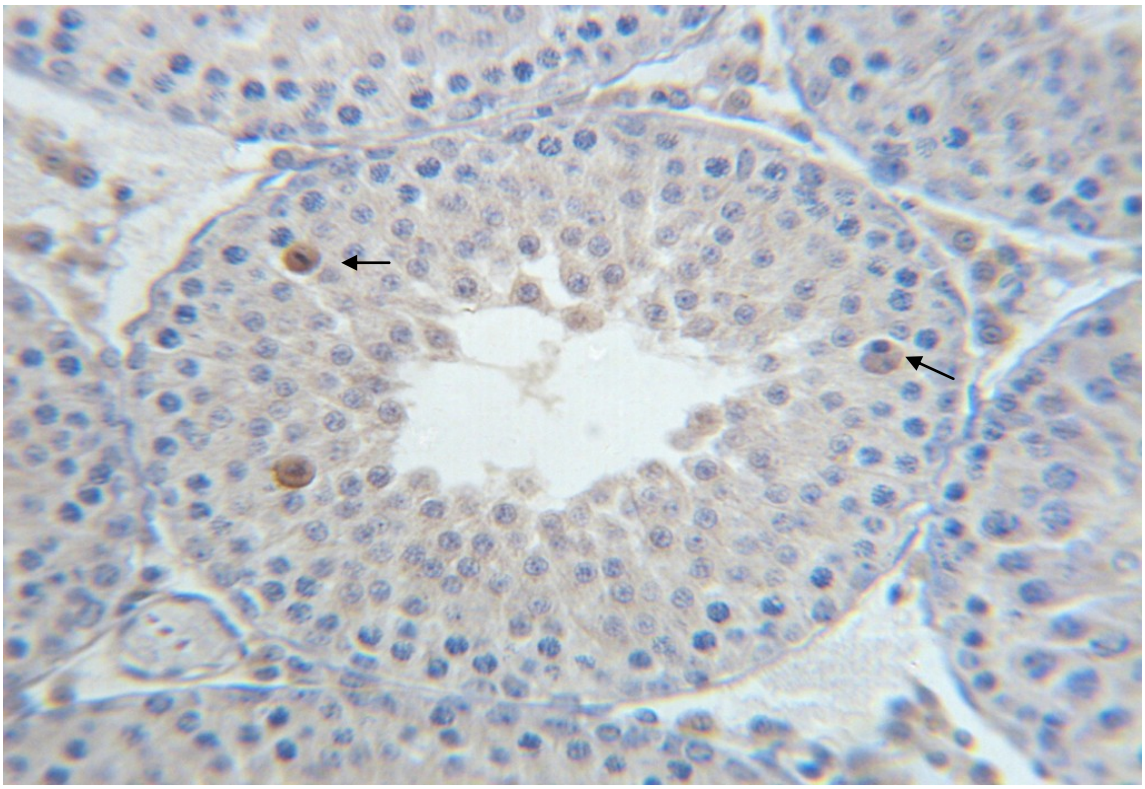


Abb. 6: Rattenhoden, **35 pnd**, Paraffinschnitt, **Fixierung: Bouin, TUNEL und Hämalaun.** Endvergrößerung: 800x. 1 cm der Abbildung entspricht 12 µm des Gewebes.

Sichere Abgrenzung zwischen Tubuli und Interstitium sowie der Zellkerne. Die dünnen Pfeile weisen auf Mitosefiguren in positiven Zellen.

Es finden sich jedoch auch scheinbar signifikant positive, zytoplasmatische Reaktionen im Interstitium. Die Zellkerne und die intranukleären Strukturen sind hierbei gut abgrenzbar, ebenso die Plasmagrenzen. (Abb. 7) Wie sich jedoch in Abb. 8, einer Negativkontrolle, zeigt, handelt es sich hier um eine unspezifische Färbung.

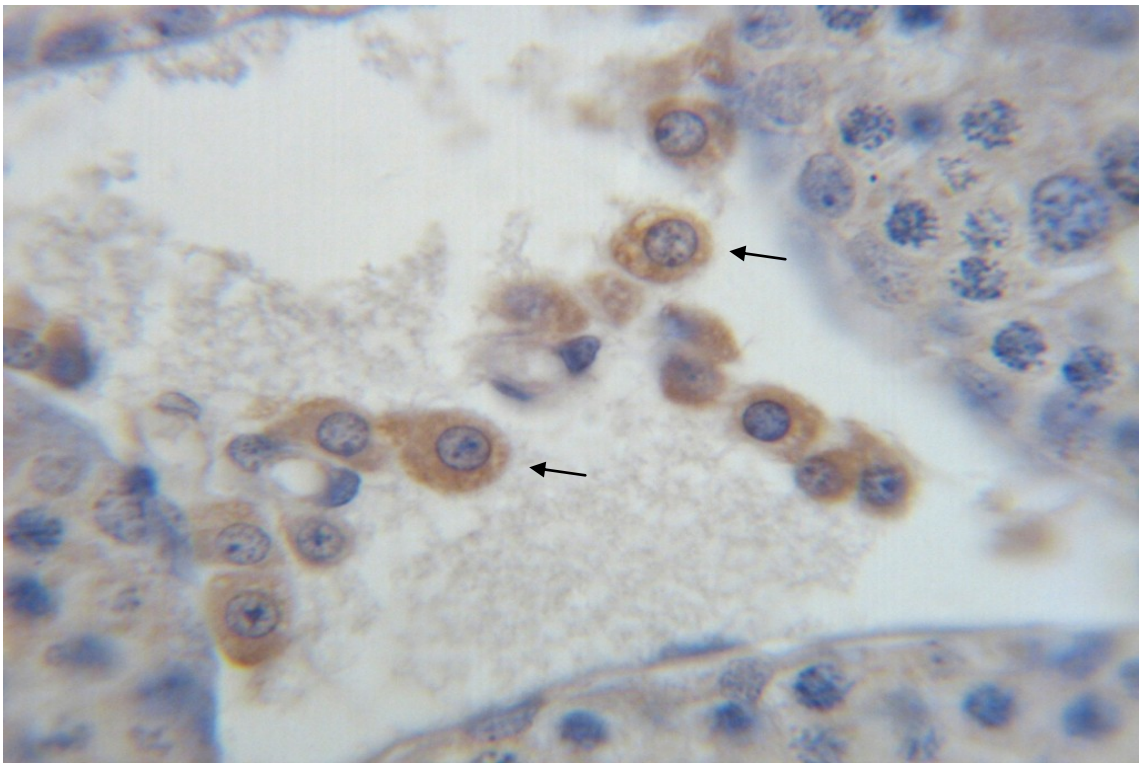


Abb. 7: Rattenhoden, **35 pnd**, Paraffinschnitt, **Bouin**, **TUNEL und Hämalaun**. Endvergrößerung 2000x. 1 cm der Abbildung entspricht 5 µm des Gewebes.

Unspezifische plasmatisch positive Leydig Zellen (Pfeile). (Vergleich mit der Negativkontrolle in Abb. 8.)

Die mit TUNEL und Hämalaun gefärbten Negativkontrollen, weisen häufig eine unspezifische Färbung in den interstitiellen Zellen auf, wie Abb. 8 zeigt.

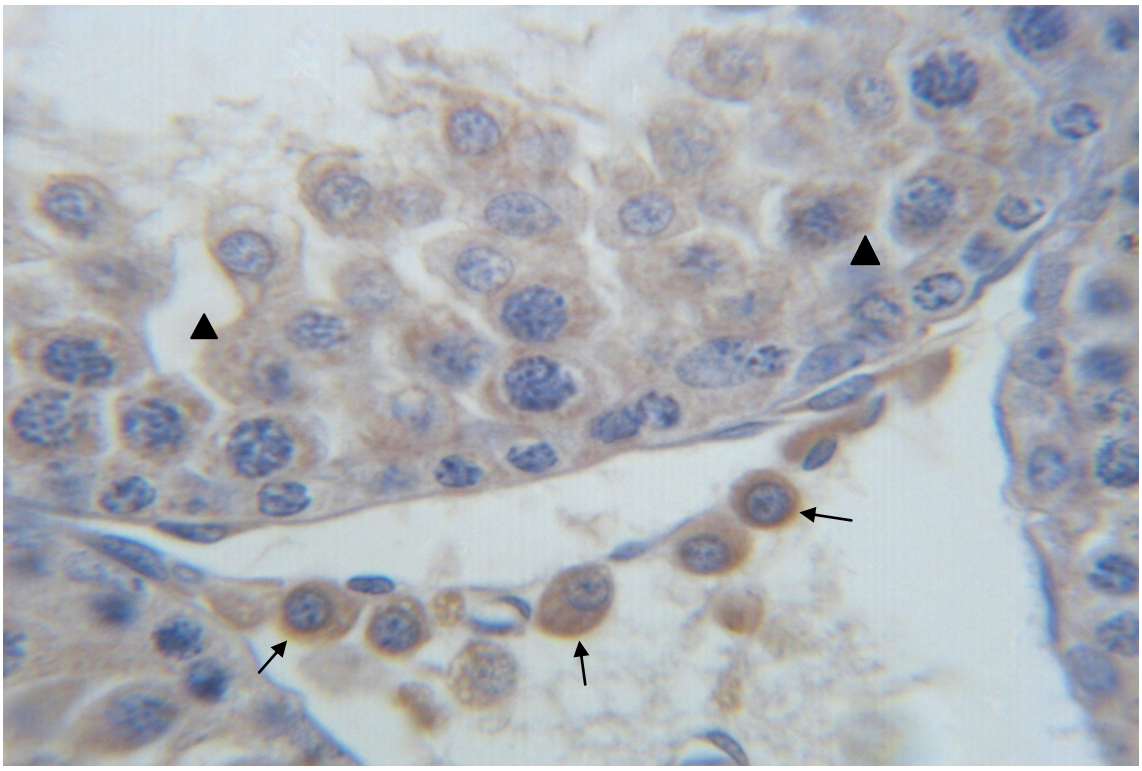


Abb. 8: Rattenhoden, **35 pnd**, Paraffinschnitt, **Fixierung: Bouin, *Negativkontrolle* TUNEL und Hämalaun**. Endvergrößerung: 2000x. 1 cm der Abbildung entspricht 5 µm des Gewebes.

Die dünnen Pfeile zeigen unspezifische zytoplasmatische Anfärbungen in den Leydig Zellen, die dicken Pfeilköpfe weisen auf die unspezifische Hintergrundfärbung tubulär.

Es fällt jedoch insbesondere bei Bouin-fixierten Präparaten auf, dass sich unspezifische Färbungen des Zytoplasmas finden. (Abb. 9)

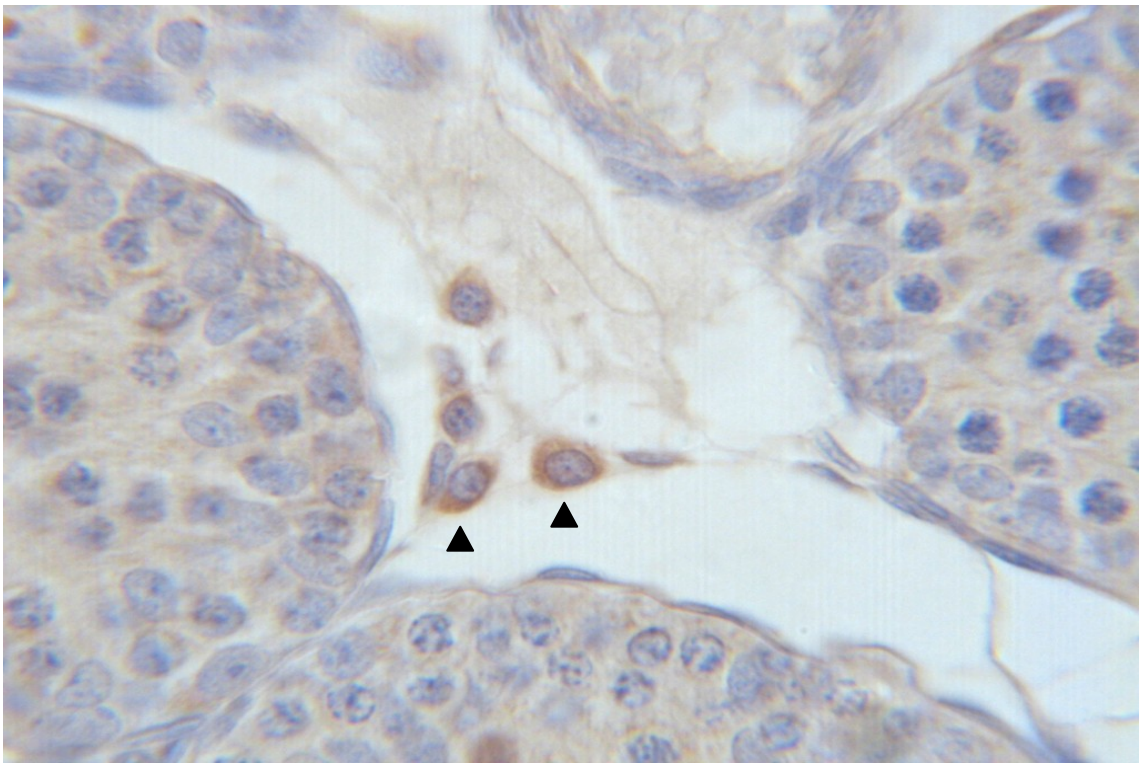


Abb. 9: Rattenhoden**, 20 pnd,** Paraffinschnitt**, Fixierung**: **Bouin, TUNEL und Hämalaun**. Endvergrößerung: 800x. 1 cm der Abbildung entspricht 12 µm des Gewebes.

Unspezifische Braunfärbung im Zytoplasma einiger Leydig Zellen (Pfeilköpfe).

3.2 Befunde nach der Fixierung mit der Lösung PLP

Bei den PLP-fixierten Schnitten zeigte sich in der alleinigen TUNEL-Färbung ebenfalls eine unzureichende morphologische Abgrenzbarkeit der Tubuli und interstitiellen Räume. Die Präparate, die mit TUNEL und Hämalaun angefärbt wurden, weisen eine gute Morphologie auf und zeigen ein zufriedenstellendes Färbeverhalten. (Abb. 10+11)

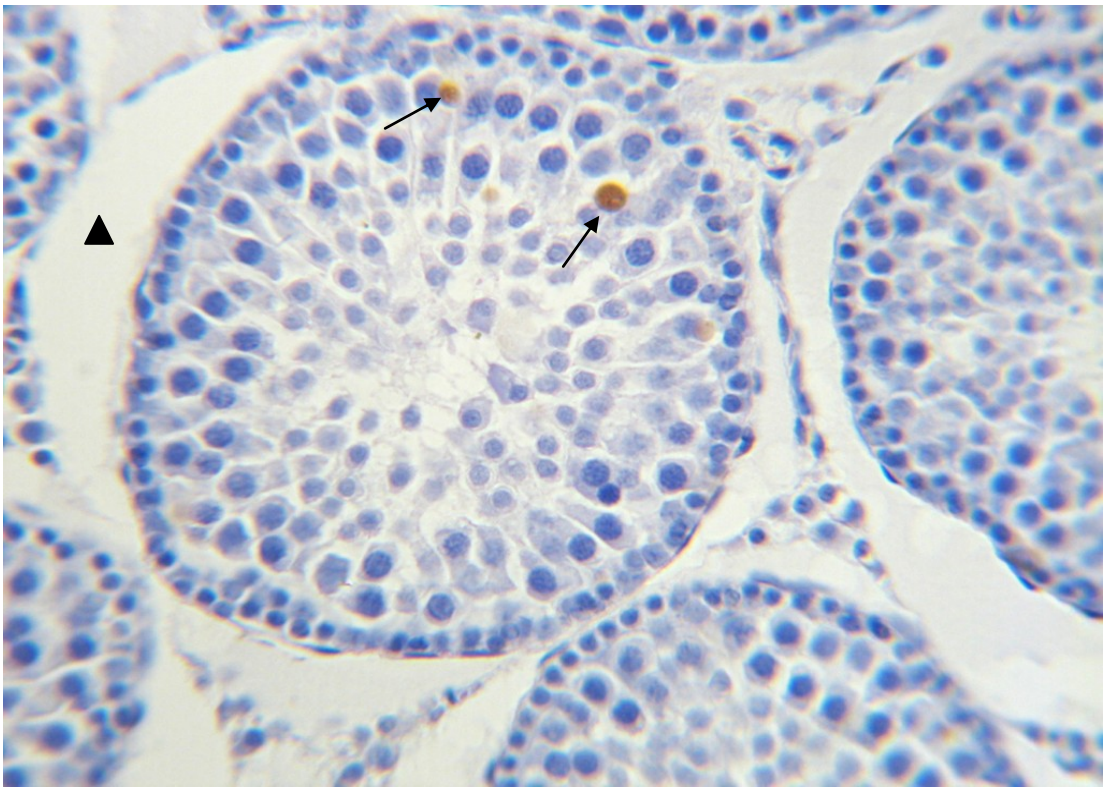


Abb. 10: Rattenhoden, **35 pnd**, Paraffinschnitt, **Fixierung: PLP, TUNEL und Hämalaun**. Endvergrößerung: 800x. 1 cm der Abbildung entspricht 12 µm des Gewebes.

Gute Morphologie mit tubulärer Kernfärbung zweier apoptotischer Spermatozyten (dünner Pfeil), künstliche Schrumpfungsräume (dicker Pfeilkopf).

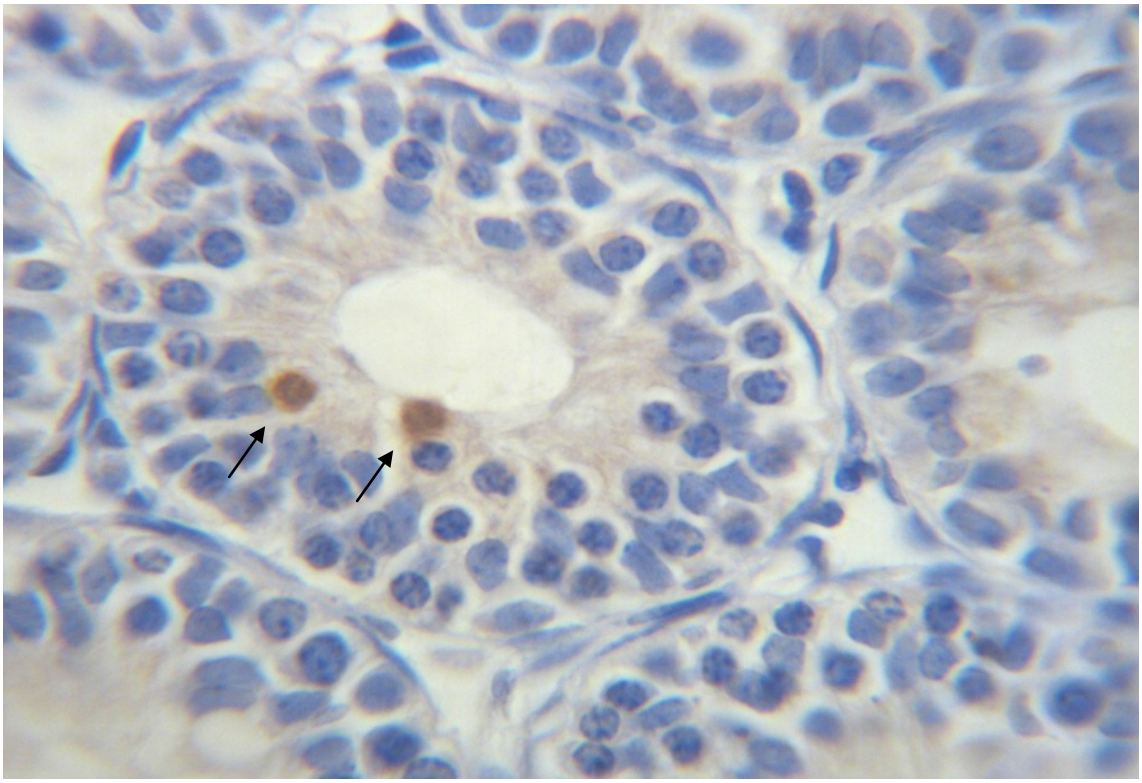


Abb. 11: Rattenhoden, **15 pnd**, Paraffinschnitt, **PLP, TUNEL und Hämalaun**. Endvergrößerung: 2000x. 1 cm der Abbildung entspricht 5 µm des Gewebes.

Zellkerne blau, apoptotische Zellkerne der Spermatozyten braun (Pfeile). Keine unspezifische Hintergrundfärbung.

Die Negativkontrollen sind sauber, ohne jegliche Braunfärbung wie Abb. 12 zeigt.

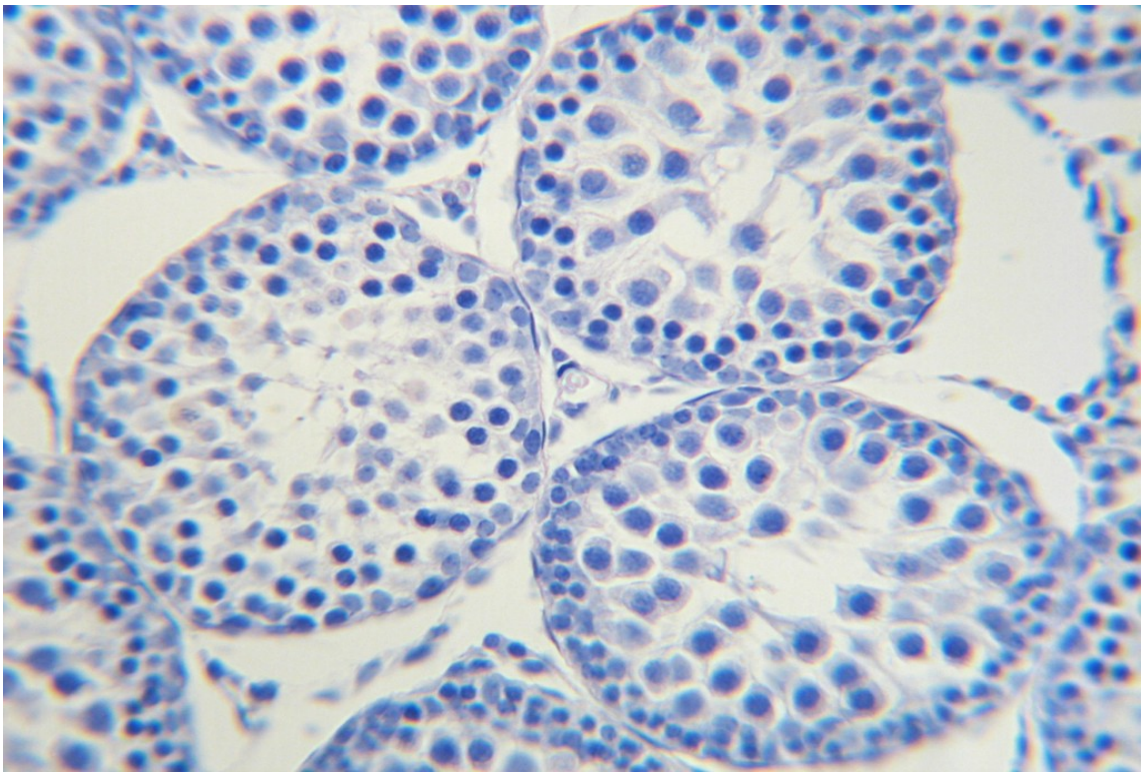


Abb. 12: Rattenhoden, **25 pnd**, Paraffinschnitt, **Fixierung: PLP, *Negativkontrolle* TUNEL und Hämalaun**. Endvergrößerung: 800x. 1 cm der Abbildung entspricht 12 µm.

Saubere Darstellung des Gewebes ohne Hintergrundfärbung oder artefizielle Anfärbungen.

Auch in PLP-fixierten Schnitten fallen positive nukleäre Reaktionen in den diplotänen Spermatozyten (zweite meiotische Teilung) auf. Daneben finden sich meiotische Zellen ohne Immunreaktion. (Abb. 13)

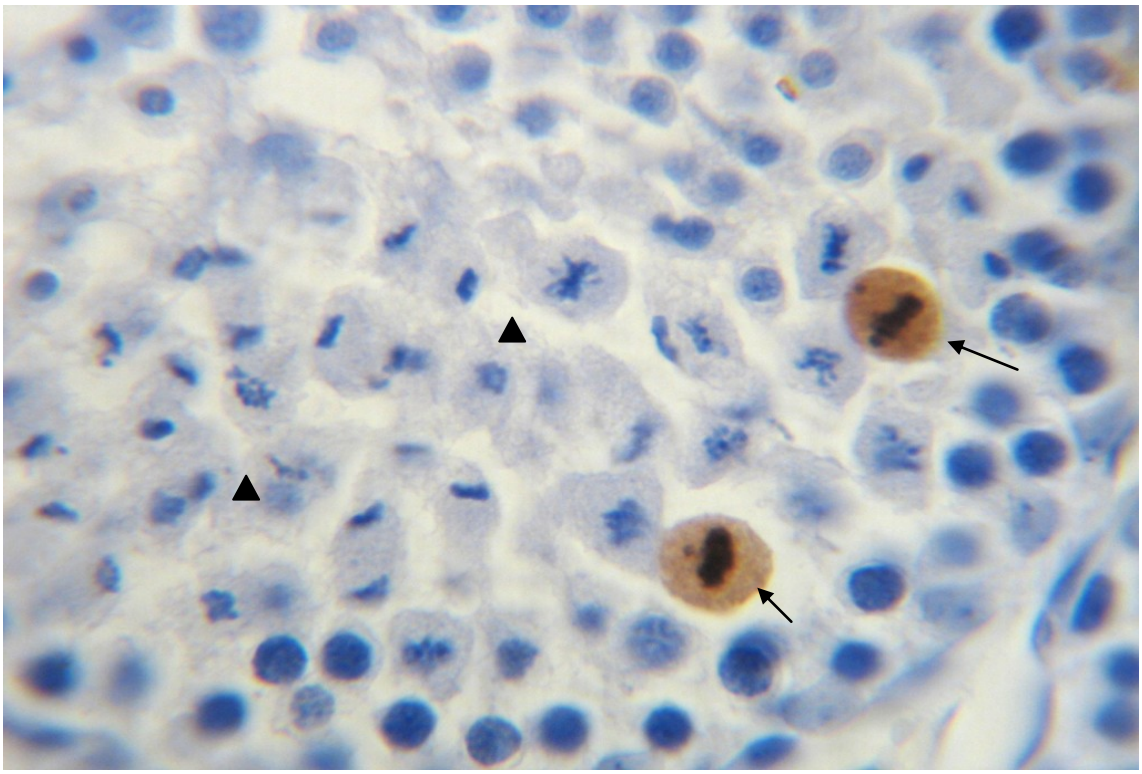


Abb. 13: Rattenhoden, **35 pnd**, Paraffinschnitt, **Fixierung: PLP, TUNEL und Hämalaun**. Endvergrößerung: 2000x. 1 cm der Abbildung entspricht 5 µm des Gewebes.

Nukleäre Farbreaktion bei den diplotänen Spermatozyten (zweite meiotische Teilung) (dünne Pfeile) neben zahlreichen Mitosen ohne TUNEL-positive Kernfärbung (dicke Pfeilköpfe).

3.3 Befunde nach der Fixierung mit Paraformaldehyd

Die Paraformaldehyd-fixierten Schnitte zeigen erhebliche Veränderungen der Morphologie des Hodens. Die Zellen weisen Schrumpfungen auf, so dass sich die nukleären Strukturen nicht oder nur andeutungsweise erkennen lassen, die Tubuli verdichten und die Interstitien auseinanderreißen. Es entstehen dabei große künstliche Schrumpfungsräume zwischen dem interstitiellen Gewebe und der Tubuli seminiferi (Abb. 14). Dies kommt besonders bei den Altersstufen ab dem 10 pnd zum Tragen. Das Färbeverhalten ist zufriedenstellend, die Negativkontrollen sind sauber (Abb. 15).

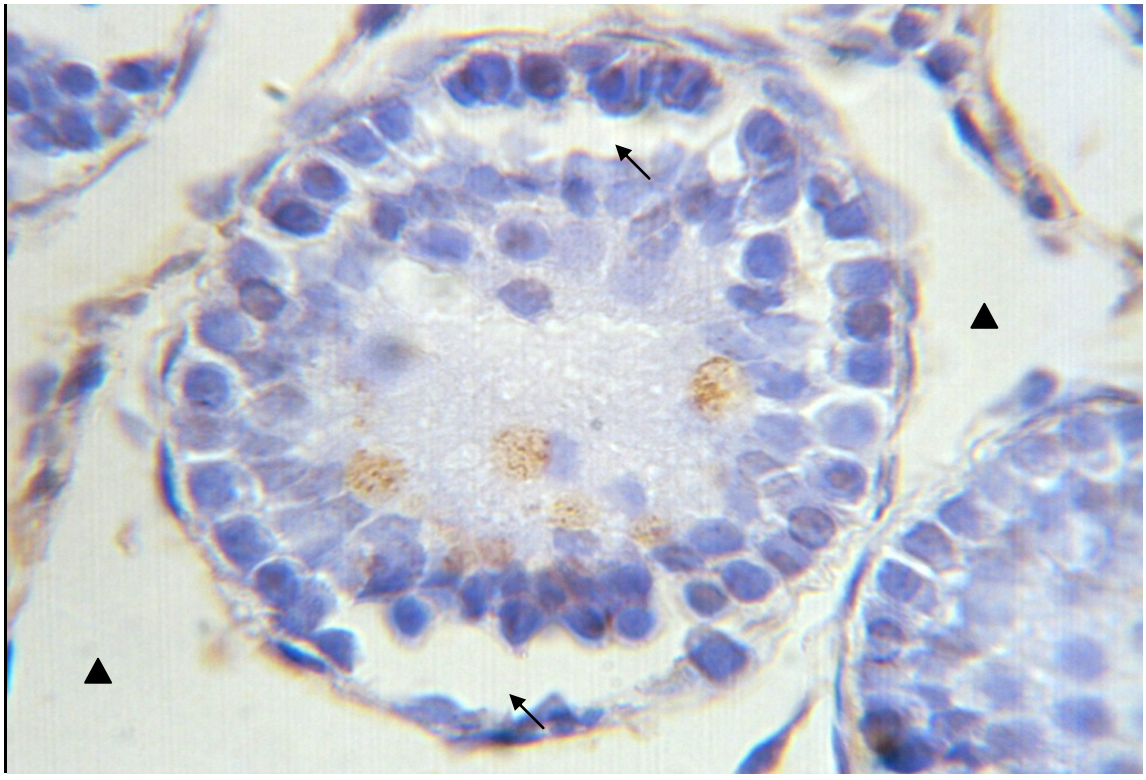


Abb. 14: Rattenhoden, **20 pnd**, Paraffinschnitt, Fixierung **Paraformaldehyd**, **TUNEL und Hämalaun**. Endvergrößerung: 2000x. 1 cm der Abbildung entspricht 5 µm des Gewebes.

Zwei Änderungen beeinträchtigen die Morphologie: 1. Große Spalträume (dicke Pfeilköpfe) zwischen den benachbarten Tubuli seminiferi. 2. Erweiterungen des Raumes zwischen den Spermatogenesezellen innerhalb eines Tubulus seminiferus (dünne Pfeile).

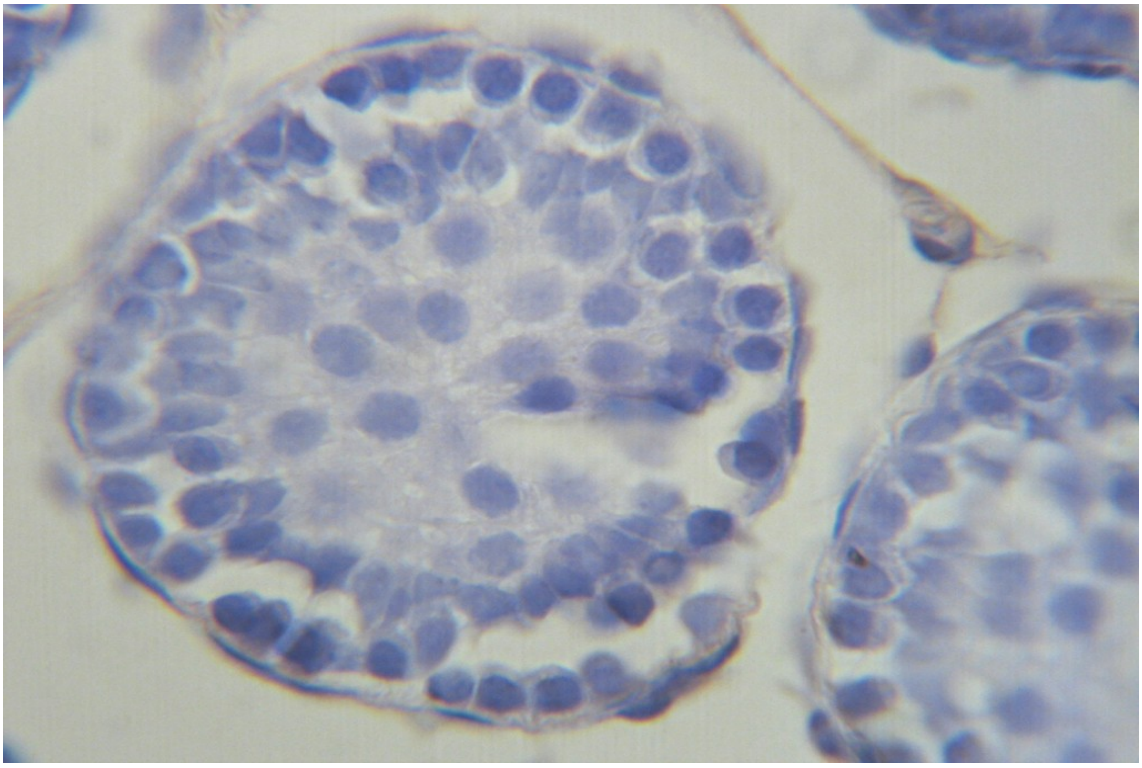


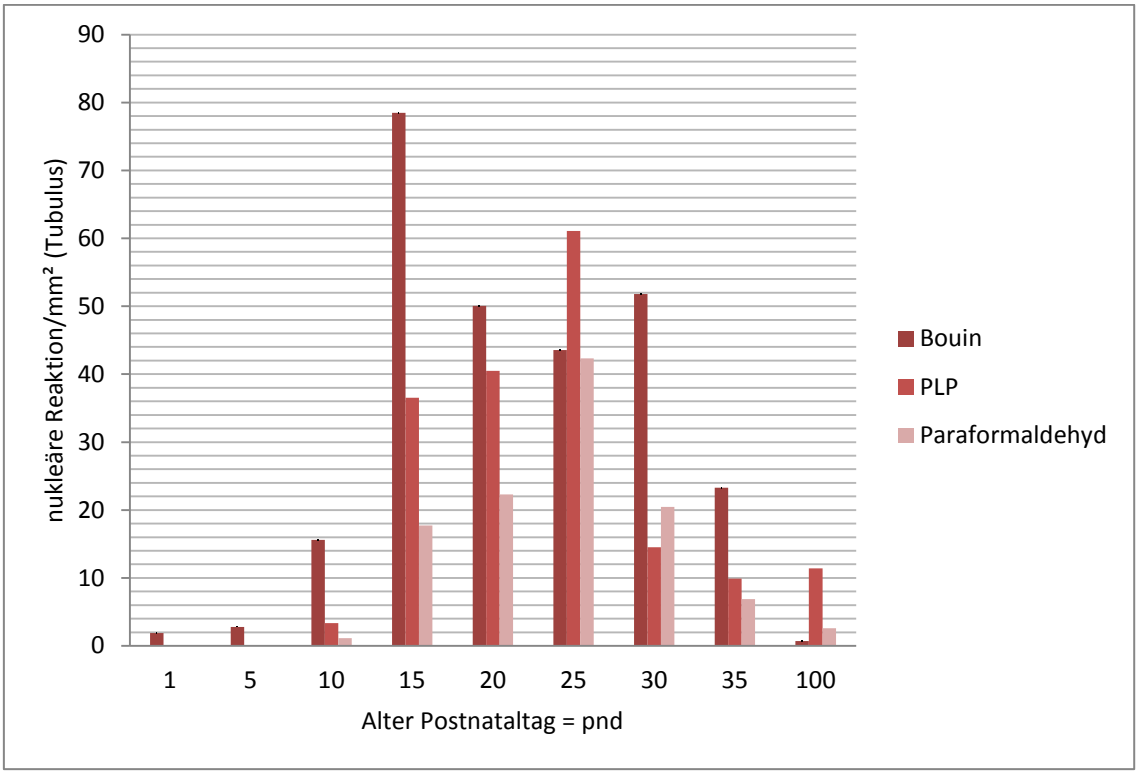
Abb. 15: Rattenhoden, **20 pnd**, Paraffinschnitt, **Fixierung: Paraformaldehyd**, ***Negativkontrolle*** **TUNEL und Hämalaun**. Endvergrößerung: 2000x. 1 cm der Abbildung entspricht 5 µm des Gewebes.

Die Gewebeerhaltung ist erheblich gestört: große Schrumpfungsräume zwischen dem interstitiellen Gewebe und den Tubuli seminiferi. Die unspezifische Färbung ist auf die Basalmembran bzw. das Zytoplasma beschränkt.

3.4 Befunde über die Zellzählungen: Ein Vergleich der drei Fixierungsmethoden

3.4.1 Tubuli seminiferi

In den Tubuli zeigt sich in den Bouin-fixierten Schnitten ein Anstieg der nukleären Reaktionen ab dem 10 pnd mit einem Maximum am 15 pnd von 78 apoptotischen Zellen/mm². (Abb. 16)



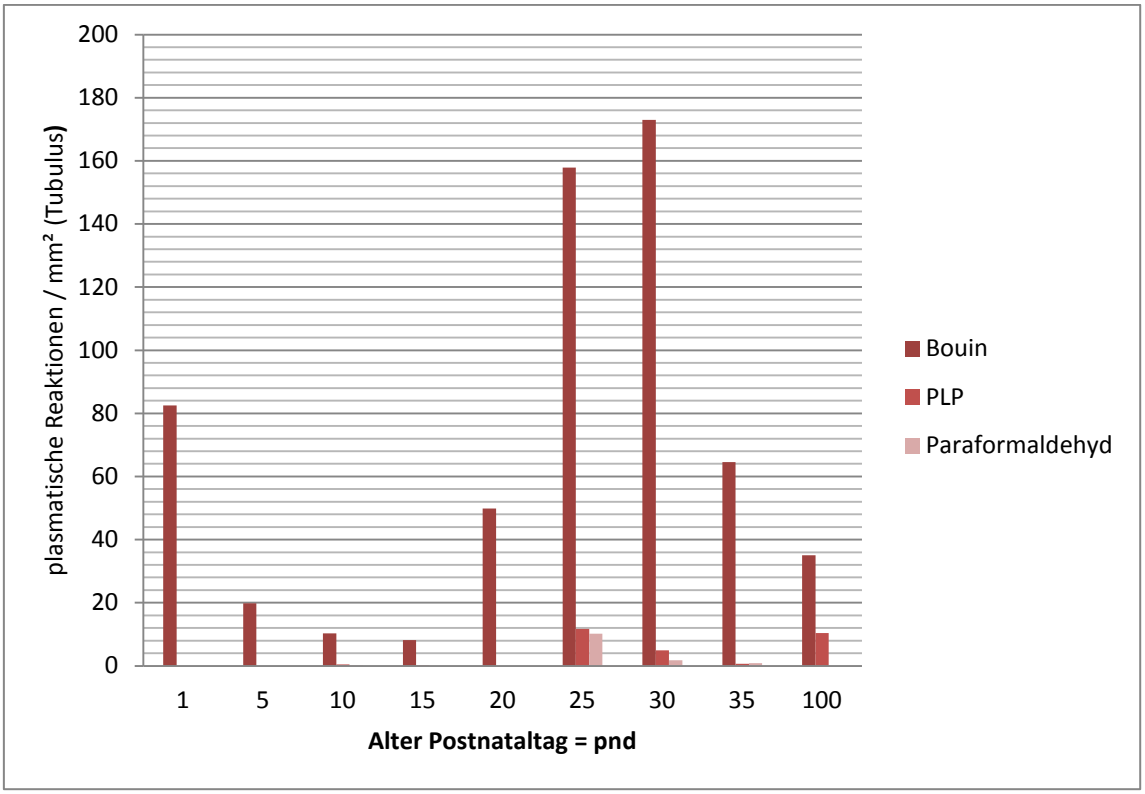
Fixierung	1 pnd	5 pnd	10 pnd	15 pnd	20 pnd	25 pnd	30 pnd	35 pnd	100 pnd
Bouin	1,41	1,77	13,86	50,09	77,85	108,07	133,34	33,26	2,04
PLP	0	0	3,14	44,44	52,73	97,61	60,29	38,03	24,39
Paraformaldehyd	0	0	1,12	25,59	11,65	60,39	59,99	25,51	2,02

Abb. 16: Zellen im Tubulus seminiferus mit ***nukleären*** Reaktionen /mm² bei drei verschiedenen Fixierungen mit TUNEL und Hämalaun in den Altersstufen 1 bis 100 pnd. Mittelwert.

Separat tabellarisch die einfache +/- Standardabweichung der nukleären Reaktionen / mm² im Tubulus seminiferus bezogen auf das Alter in Abhängigkeit der Fixierung.

Die hohe Apoptose-Rate hält nach einem Rückgang um ca. 37 %, mit Übergang in eine Plateau-ähnliche Phase, bis zum 30. pnd an. In den beiden anderen Fixierungen zeigt sich eine ähnliche Tendenz mit glockenförmiger Verteilung, wobei bei PLP-fixierten Schnitten ein deutliches Maximum am 25 pnd zu verzeichnen ist.

Insbesondere bei Bouin-fixierten Präparaten fällt auf, dass sich scheinbar spezifische Färbungen des Zytoplasmas der Spermatogenese-Zellen finden. Zum einen direkt postnatal und dann erneut mit einem langsamen Anstieg ab dem 20 pnd und einem Maximum um den 30 pnd. Anschließend fallen die plasmatischen Reaktionen in den Tubuli wieder ab. In den PLP-und Paraformaldehyd-fixierten Schnitten ist dies fast nicht zu beobachten. Diese Beobachtung wird in Abb. 17 veranschaulicht. Die Kernstrukturen sind in diesen Zellen gut abzugrenzen.



Fixierung	1 pnd	5 pnd	10 pnd	15 pnd	20 pnd	25 pnd	30 pnd	35 pnd	100 pnd
Bouin	37,84	25,18	23,96	19,15	347,66	438,95	350,06	169,1	75,11
PLP	0	0	0,7	0,71	0	18,3	68,72	4,83	45,74
Paraformaldehyd	0	0	0,5	0	0	15,4	5,8	3,21	0

Abb. 17: Zellen im Tubulus seminiferus mit ***zytoplasmatischen*** Reaktionen /mm² bei drei verschiedenen Fixierungen mit TUNEL und Hämalaun in den Altersstufen 1 bis 100 pnd. Mittelwert.

Separat tabellarisch die einfache +/- Standardabweichung der zytoplasmatischen Reaktionen / mm² im Tubulus seminiferus bezogen auf das Alter in Abhängigkeit der Fixierung.

Bereits in den Vorversuchen deutete sich an, dass die TUNEL-Methode auch Zellen anfärbt, die Mitosefiguren aufweisen. Es fällt bei allen drei Fixierungen auf, dass sich sowohl in der alleinigen TUNEL-Darstellung als auch in den Färbungen mit Hämalaun, nukleäre Farbreaktionen in den Tubuli seminiferi bei mitotischen Zellen zeigen. Die Nachweise fanden sich in den Altersgruppen der 25 bis 35 Tage alten Tiere mit einem Gipfel um den 30 pnd. Die Schnitte der jüngeren und auch die der älteren Tiere zeigten nur vereinzelt mitotische nukleäre Farbreaktionen.

Es fällt weiterhin auf, dass sich die positiven Mitosen nicht nur in einer bestimmten Phase befinden, sondern dass dies in allen Phasen zu beobachten ist.

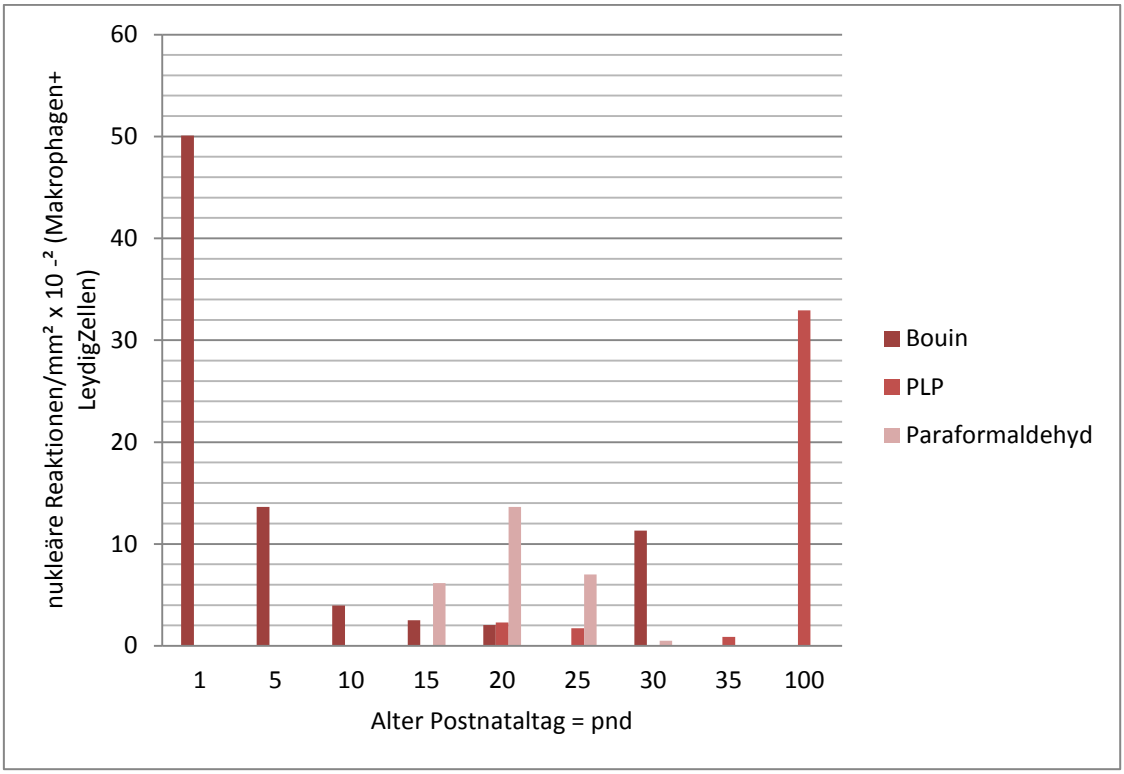
Diese mitotischen Reaktionen finden sich besonders in der Metaphase und der Prophase. In der Telophase und der Anaphase treten sie verschwindend gering auf.

3.4.2 Interstitielle Zellen

Bei den interstitiellen Zellen, insbesondere den Fibroblasten, zeichnet sich in den Paraformaldehyd-fixierten Präparaten ein schubförmiger Anstieg der TUNEL-positiven Kernreaktionen um den 20 pnd ab. In den anderen Fixierungen ist dies nicht zu beobachten. Bei Bouin-fixierten Schnitten findet sich ein deutlicher Anstieg der plasmatischen Reaktionen (einer unspezifischen Färbung) vom 20 pnd bis zum 35 pnd mit einem Maximum am 25 pnd von 113 positiven Reaktionen/mm^2.

Makrophagen und Leydig-Zellen weisen direkt postnatal eine vergleichsweise hohe Rate an positiven Kernreaktionen auf, was in den Bouin-fixierten Schnitten besonders deutlich wird.

Zudem zeigt sich hierbei noch ein leichter Anstieg der apoptotischen Zellkerne um den 30 pnd. Bei Paraformaldehyd-fixierten Präparaten besteht ein glockenförmiger Verlauf der positiven Kernreaktionen um den 20 pnd. PLP-fixierte Hoden weisen keine signifikanten nukleären Reaktionen auf. (Abb. 18)



Fixierung	1 pnd	5 pnd	10 pnd	15 pnd	20 pnd	25 pnd	30 pnd	35 pnd	100 pnd
Bouin	1	0	0,25	0,25	0,28	0	0,81	0	100,97
PLP	0	0	0	0	0,25	0,25	0	0,25	1,65
Paraformaldehyd	0	0	0	0,59	0,44	0,7	0,19	0	0

Abb. 18: **Makrophagen** und **Leydig Zellen** mit ***nukleären*** Reaktionen /mm² bei drei verschiedenen Fixierungen mit TUNEL und Hämalaun in den Altersstufen 1 bis 100 pnd. Mittelwert.

Separat tabellarisch die einfache +/- Standardabweichung der nukleären Reaktionen / mm² der Makrophagen und Leydig Zellen bezogen auf das Alter in Abhängigkeit der Fixierung.

Plasmatisch weisen Makrophagen und Leydig Zellen einen Gipfel der positiven Reaktion am 30 pnd auf. Dies wird fast ausschließlich in den Bouin-fixierten Schnitten deutlich. (Abb. 19)

Die beiden anderen Fixierungen zeigen keine signifikanten plasmatischen Reaktionen, außer der Nachweis von 55 positiven plasmatischen Reaktionen pro mm² bei PLP-fixierten Präparaten am 10 pnd. Bei Bouin-fixierten Hoden verhält sich der Kurvenverlauf der Plasmareaktionen ähnlich dem der Kernreaktionen. Bei beiden ist ein postnataler Anstieg mit anschließendem Abfall bei einem Minimum um den 10 bis 15 pnd und folgenden Anstieg 30 pnd zu verzeichnen.

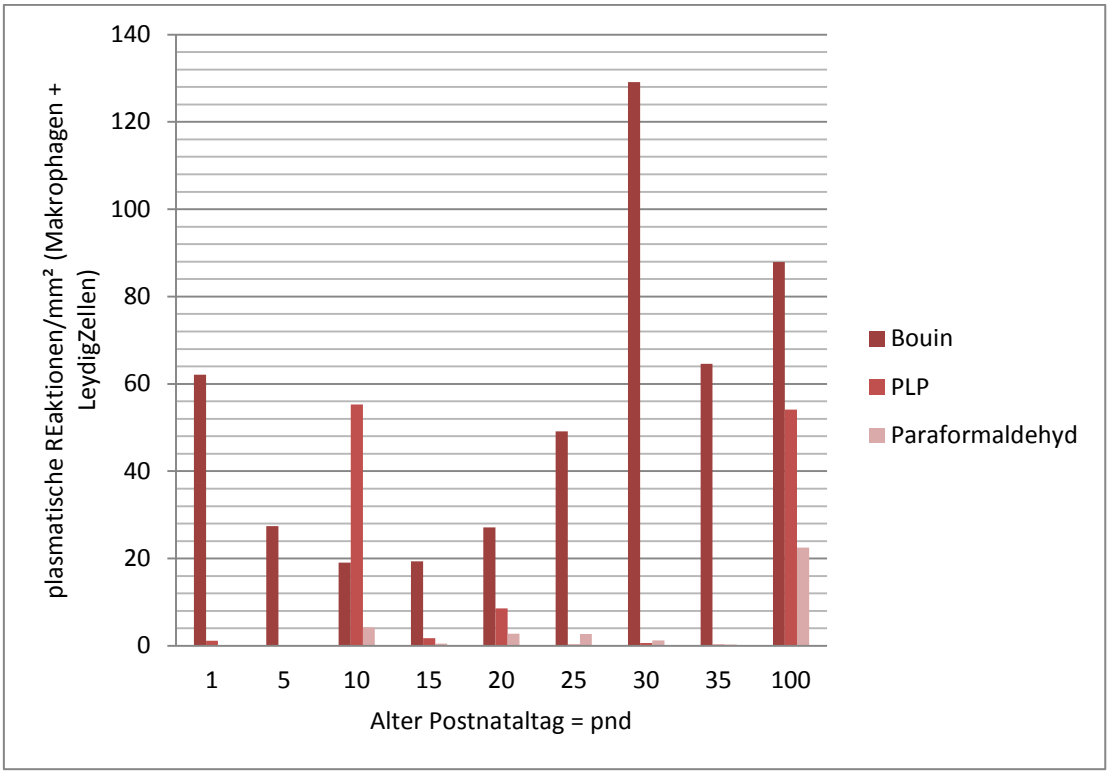


Abb. 19: Makrophagen und Leydig-Zellen mit plasmatischen Reaktionen /mm² bei drei verschiedenen Fixierungen mit TUNEL und Hämalaun in den Altersstufen 1 bis 100 pnd. Mittelwert.

Bei Bouin-Fixierung ist diese Färbung eindeutig unspezifisch, da auch die Negativkontrolle diese Färbung aufweist.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit liefert eine kritische Studie über die Aussagekraft der TUNEL-Methode für den Apoptosevorgang im Hoden der Wistarrate. Diese Dissertation vergleicht die Markierung der apoptotischen Zellen in Hoden von Wistarratten zwischen dem 1 und 100 postnatalen Tag, nach Auswertung der drei verschiedenen Fixierungsmethoden: Bouin, PLP und Paraformaldehyd.

4.1 Die TUNEL-Methode

Ein Charakteristikum der Immunhistochemie ist der indirekte Nachweis von bestimmten Proteinen oder Strukturen, welche selbst als Antigen fungieren können oder denen ein Antigen angehangen wird, welches mittels eines markierten Antikörpers die Visualisierung der Zielstruktur ermöglicht. Bei der Apoptose wird die DNA im Zellkern gespalten, so dass 3‘-OH-Gruppen frei werden. An diese werden mittels einer Transferase markierte Nukleotide angehangen, an welche ein Farbstoff (hier DAB) binden kann, so dass sie wie in der vorliegenden Untersuchung lichtmikroskopisch dargestellt werden können.

Bei der TUNEL-Methode sind die freien 3‘-OH-Gruppen (**N**ick **e**nds) die Zielmoleküle. Die **T**dT (**T**erminal desoxynucleotidyl transferase) bindet daran markierte Nukleotide, das d**U**TP (Desoxy-Uridintriphosphat), welches mittels Diaminobenzidin visualisiert werden kann.

In der Literatur wird diese TUNEL-Methode zur Darstellung der Apoptose sehr kontrovers diskutiert. Csizmadia et Csizmadia (2009) konnte zeigen, dass die Ergebnisse zum Teil von den verwendeten TUNEL Assay Kits abhängen und somit zu schlechteren oder auch mehrdeutigen Ergebnissen führen können. Labat-Moleur et al. (1998) fand keine wesentlichen Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den Kits.

Aber auch Grasl-Kraupp et al. (1995) erhielt zweifelhafte Befunde. In seinen Untersuchungen war nicht sicher zu unterscheiden, ob es sich wirklich um apoptotische oder nekrotische Zellen handelte. Loo (2011) konnte dies bestätigen. In seinen Versuchen konnte er TUNEL-positive Reaktionen in „ nicht-apoptotischen Zellen, inklusive nekrotischen Zellen, Zellen mit laufenden DNA-Reparaturen, mechanisch zerstörte Zellen und Zellen mit aktiven Transkriptionsvorgängen“ nachweisen, so dass er zu dem Schluss kommt, das TUNEL zum Nachweis von DNA-Fragmenten dienen kann, aber nicht sicher zum Nachweis von Apoptose. Auch Popvska et al. (1999) sowie Nishizaki et al. (1999) wiesen sowohl Apoptose als auch Nekrose nach.

Hayashida et al. (2009) beobachtete in einer Untersuchung mitochondrialer DNA an Mäusehoden eine erhebliche plasmatische positive Reaktion, die die nukleäre noch überstieg, wobei das Zytoplasma häufig schlecht vom Zellkern abzugrenzen war. Ebenso konnte er TUNEL-positive Spermatozyten in der Metaphase nachweisen. Diese Beobachtung konnten wir ebenfalls machen. Auch in unseren Untersuchungen fanden sich meiotische Zellen mit positiver TUNEL-Reaktion.

Frankfurt et Krishan (2001) zeigten, dass 90 – 100 % der untersuchten nekrotischen Zellen positive Reaktionen für TUNEL aufwiesen. Auch Barth et al. (2002) sah eine Darstellung der Apoptose allein mit der TUNEL-Methode sehr kritisch, so dass er für die Elektronenmikroskopie eine Kombination aus der TUNEL-Methode mit Nanogold entwickelte. Hierunter konnte eine deutlich bessere Visualisierung der apoptotischen Zellen, allerdings im Rattenhirn, beobachtet werden. Ob dies auch auf testikuläre Gewebe zutrifft, ist bis dato nicht untersucht. Auch Kelly et al. (2002) erhielten in den Untersuchungen zu Spezifität und Sensitivität sehr kritisch zu wertende Ergebnisse. So variierte die Sensitivität zwischen 60 und 91%, die Spezifität bewegte sich zwischen 87 und 70%.

Dass mittels der TUNEL-Methode auch Proteine, die sich in räumlicher Nähe der DNA befinden, markiert werden, konnten Negoescu et al. (1998) zeigen. Sie wiesen nach, dass TUNEL mit sowohl mit kondensierter DNA als auch mit naheliegenden Eiweißen reagierte. Sie sehen in der Konsequenz jedoch keine Notwendigkeit zur

Modifikation der Methode selbst, sondern empfehlen eine Optimierung oder Änderung der Vorbehandlung.

Später zeigte Frankfurt an Gefrierschnitten, dass optimale Ergebnisse durch vorheriges leichtes Erwärmen zu erzielen sind (2004). Die Vorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle scheint keinen relevanten Einfluss auf die Spezifität von Nachweismethoden zu haben. Negoescu et al. (1996) sowie Christina M. et al. (2006) kamen zu dem Schluss, dass die Vorbehandlung in der Mikrowelle in Zusammenspiel mit einem weiteren Marker, unabhängig von der Fixierung, die besten Ergebnisse liefere. Sanchez et al. (2002) fand keine Nachteile in einer vorangehenden Mikrowellenbehandlung und betrachtete die Zeitersparnis als ausschlagendgebendes Argument. Feirabend et Ploeger (1991) beobachteten keine Unterschiede zwischen in der Mikrowelle vorbehandelten Schnitten und im herkömmlichen Ofen erhitzten Geweben. Sie stellten dies an menschlichen Gehirnpräpatataten fest. Noyan et al. (2000) konnten diese Ergebnisse auf die Rattenleber übertragen. Inwiefern dies auf den Rattenhoden zu übertragen ist, bleibt offen. Login und Dvorak (1994) sehen die Vorbehandlung in der Mikrowelle sehr positiv, was in einer Versuchsreihe mit verschieden Erhitzungsmethoden untersucht wurde. Besonders hervorzuheben ist der logistische Vorteil bei zufriedenstellender Morphologie und guter Färbbarkeit. Leonhard und Shepardson (1994) untersuchten bei Mikrowellen-behandelten zudem die Abkühlungsmethoden bzw. eine Mikrowellenbehandlung ohne Temperaturerhöhung, was jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse hervorbrachte. Emerson et al. (2006) bestätigten die Gleichwertigkeit von Mikrowellenbehandlung und herkömmlichen Verfahren in Bezug auf Qualität sowie Intensität und immunohistochemischen Eigenschaften. Aus deren Sicht stellen immunohistochemische Untersuchungen keine Kontraindikationen für Behandlungen in der Mikrowelle dar.

Dass die Dauer der Fixation einen Einfluss auf die Spezifität der TUNEL-Methode hat zeigte die Gruppe um Tamura et al. (2000). Sie stellten fest, dass das Einlegen in eine Fixierlösung deutlich bessere Ergebnisse in der Visualisierung apoptotischer Zellen ergibt, als eine einfache Perfusion, in deren Rahmen das

Gewebe oder das Organ nur kurz mit der Fixierlösung in Kontakt kommt und somit nur unzureichend eindringen kann.

Labat-Moleur et al. (1998) verzichtete auf die Blockade der endogenen Peroxidase mit H_2O_2, da sie die „TdT-Aktivität schwächt (Migheli et al. 1995) und DNA-Brüche hervorrufen kann (Wijsmann et al. 1993)“.

Tateyama et al. (1998) kam im Rahmen einer methodenkritischen Arbeit zu dem Ergebnis, dass die Dauer der Fixierung einen erheblichen Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse hat. Je länger die Fixierung dauerte, desto höher war die Anzahl an positiven Zellen. Stähelin et al. (1998) beobachtete an Lebergewebe, dass die Anzahl der positiven Zellen abhängig von der Einwirkdauer der Proteinase K ist. Um diesem Effekt entgegenzuwirken wurden die Schnitte mit Diethyl-Pyrocarbonate (DEPC) vorbehandelt. Als Ursache werden endogene Nukleasen in den Hepatocyten genannt, die mittels der Vorbehandlung blockiert werden sollen. Die Anzahl der falsch positiv markierten Zellen konnte somit erheblich reduziert werden. Hier reiht sich auch die Arbeit von Dorandeu et Lorin de la Grandmaison (2013) ein, die diesen Aspekt aus forensischer Sicht an Hautzellen untersuchten und feststellten, dass mit zunehmender postnataler Bearbeitungsdauer die Anzahl der nachgewiesenen Apoptosen stieg, und somit diese Methode in der forensischen Pathologie sehr kritisch betrachten. Dass die Bearbeitungszeit und die angewendeten Verfahren zur Fixierung keinen Einfluss auf die Morphologie haben sollen, ergaben Untersuchungen der Gruppe um Sekoni et al. (1981) an Bullensperma. Allerdings sind diese Aussagen mehr als 30 Jahre alt und entsprechen dem damaligen Stand der Technik und Wissenschaft und sind mit den heutigen Möglichkeiten und dem aktuellen Wissensstand nicht mehr haltbar.

Auch die Einbettung hat einen erheblichen Einfluss auf die Morphologie der Präparate. So konnte van der Steen et al. (1992) bereits früh an Lebergewebe zeigen, dass Kryostat-Schnitte eine besser erhaltene Morphologie aufweisen als in Paraffin eingebettete Organe und Gewebe. Selbst alkoholfixierte Präparate wiesen in dieser Untersuchung eine bessere morphologische Qualität als Paraffinschnitte auf. Vergleichbare Ergebnisse erzielte die Gruppe um Reith et al. bereits 1984.

Dass die aus dem Fixans resultierende Gewebequalität die histologischen und histochemischen Eigenschaften eines Präparates bedingt, bewiesen Mekota et Vermehren in 2005. Ebenso konnten sie an Knorpel, Haut und Plazenta nachweisen, dass die Ergebnisse gewebespezifisch sind.

Dutta et al. (2012) konnte nachweisen, dass die Umgebungstemperatur, unter welcher die Fixierung mit TUNEL erfolgt, einen Einfluss auf das Färbeverhalten und die daraus resultierenden Ergebnisse hat. Bei Raumtemperatur wurden mehr TUNEL-positive Zellen festgestellt als bei einer Fixierungstemperatur von 4° Celsius. Diese Untersuchung wurde sowohl an Bouin-fixierten Testes als auch an Hoden, die mit modifiziertem Davidson's Fluid fixiert wurden, durchgeführt. Die besten Ergebnisse mit minimalen falsch positiven TUNEL-Reaktionen waren bei den Präparaten mit modifiziertem Davidson's Fluid bei 4° Celsius Umgebungstemperatur zu beobachten.

Auch Tateyama et al. (1998) konnte optimale Ergebnisse bei einer Vorfixierung bei 4° Celsius bestätigen. Die Organe wurden bis zu 72 Stunden bei 4° Celsius gelagert und im Folgenden bis zu 3 Wochen in der Fixierlösung aufbewahrt. Anschließend sollten die apoptotischen Zellen mittels TUNEL visualisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass je länger die Vorfixierung dauerte die unspezifischen zytoplasmatischen Reaktionen deutlich zunahmen. Sie kamen zu dem Schluss, dass eine Vorfixierung einen Zeitraum von zwei Stunden nicht überschreiten sollte, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Latendresse et al. (2002) untersuchte den Einfluss von der Fixierlösung Bouin im Vergleich zu herkömmlichem Davidson's Fluid an Augen und Hoden. Die Kriterien waren die Qualität der Morphologie sowie die Spezifität der histochemischen und immunhistochemischen Nachweisverfahren. Hierbei zeigte sich, dass die Ergebnisse mit Davidson's Fluid die Qualität der Augenpräparate in allen Punkten übertraf. Vergleichbare Resultate konnten auch für die Hodenpräparate erzielt werden.

Im gleichen Jahr wurde eine Arbeit zum generellen Einfluss der Fixierung auf die morphologischen und histochemischen Ergebnisse angefertigt (Srinivasan et al.

2002). Bereits zu Beginn der Untersuchung wird es als allgemeingültig betrachtet, dass es nicht die EINE Fixierung gibt, welche alle gewünschten und benötigten Eigenschaften besitzt und somit stets Kompromisse notwendig sein werden. Es wurden die unter anderem die Interaktionen von Formaldehyd mit RNA und DNA an Gefrierschnitten und an in Formaldehyd fixierten, betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass Formaldehyd sich an die CH_2OH-Gruppen bindet. Zudem nahm die Fixierung Einfluss auf die Bindung zwischen Aminogruppen und konnte freie Aminogruppen erzeugen. Weiterhin wurden Verzögerungen in der Bildung von Phosphodiester-Brücken beobachtet. Auch bei den Untersuchungen an RNA konnten Bindungen an CH_2OH-Gruppen nachgewiesen werden. Ergänzend wurden Strukturveränderungen der Einzelstrang-RNA festgestellt. Im Weiteren wurde nachgewiesen, dass diese Veränderungen abhängig sind von der Konzentration des Formaldehyds sowie der Temperatur der Fixierlösung und vom pH-Wert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Malmi und Söderström (1988), die verschiedene Eiweiße in Rattenhoden in unterschiedlichen Fixierungen untersuchten.

Im Rahmen von vergleichenden Untersuchungen bzw. bei Untersuchungen von speziellen Antigenen und gleichzeitiger Darstellung der Apoptose ist auch die Reihenfolge der Nachweisverfahren zu beachten, da manche Antigene die Inkubation bei 37 °C nicht überstehen können (Sweeney et al. 2012).

Ergänzend konnten Suzuki et al. (2012) nachweisen, dass bei der TUNEL-Methode das Waschen mit fließendem Wasser, unabhängig von der Dauer, keinen Einfluss auf das Färbeverhalten und die Morphologie hat.

4.2 Interpretation und Diskussion der Ergebnisse

Fixierungen beeinflussen die Morphologie und auch die Spezifität von Färbemethoden von Präparaten. „Formalin konserviert Form, Farbe und Struktur der Präparate sehr gut und durchdringt auch größere Präparate. Fette und Lipoide bleiben gut erhalten.“, (Zitat aus Mulisch et Welsch 2010). Pikrinsäure ermöglicht ein besseres Eindringen des Formalins, Ethanol führt zu Schrumpfungen.

Dass Fixierungen einen erheblichen Einfluss auf die Morphologie der zu untersuchenden Gewebe haben, zeigte auch die Gruppe um Tu et al. (2011). Sie untersuchten Rattenhoden einer unbenannten Altersstufe hinsichtlich ihrer Reaktionen und ihres Verhalten auf die Fixierung mit 4%igem Paraformaldehyd, Davidson‘s fluid und Bouin. Ähnlich der vorliegenden Untersuchung beobachteten sie artefizielle Schrumpfungen, „insbesondere zwischen den Epithelzellen der Tubuli seminiferi“ (Tu et al. 2011) bei den Paraformaldehyd-fixierten Organen. Ergänzend konnten sie dies aber in deutlich schwächerer Ausprägung auch in Bouin-fixierten Hoden nachweisen. In Präparaten, welche mit Davidson‘s fluid fixiert wurden, war keine Schrumpfung der Epithelzellen ersichtlich. Jedoch wurden auch hier Artefakte im Interstitium beobachtet. Sie führten die höherwertige morphologische Qualität in Bouin und Davidson‘s fluid auf Eisessig zurück, da er schnell eindringt und die Nukleinsäuren stabilisiert.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich in den Bouin-fixierten Schnitten nur minimale Schrumpfungsartefakte. Paraformaldehyd- und PLP-fixierte Präparate weisen analog zu den Ergebnissen von Tu et al. (2011) sowie Kiyozuka et al. (1999) deutlichere artefizielle Veränderungen und Schrumpfungen auf; Paraformaldehyd wesentlich stärker als PLP. Weiterhin fiel ebenfalls auf, dass die Kernstrukturen in Paraformaldehyd wesentlich schlechter zu beurteilen sind als in den beiden anderen Fixierungen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aussagekraft der TUNEL-Methode von der Fixierung abhängig ist. Die Befunde ergeben zum Teil signifikante Unterschiede in den Aussagen über die apoptotischen Vorgänge. Die nukleären Reaktionen innerhalb der Tubuli sind in allen drei verwendeten Fixierungen

annähernd gleich, wobei sich eine gesteigerte Anzahl apoptotischer Zellen zwischen dem 15 und 35 pnd abzeichnet. Dies könnte eine physiologisch erhöhte Rate an Apoptosen in Keimzellen oder auch Sertoli Zellen bestätigen, die innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen auftritt. (Sofikitis et al. 2006) Ähnliche Ergebnisse erzielten Watanabe et al. (2007) an Ratten, die einen Vitamin-B12-Mangel aufwiesen. Hierbei fanden sich die meisten apoptotischen TUNEL-positiven Zellen um den 21. pnd.

Plasmatische Reaktionen innerhalb der Tubuli sind fast ausschließlich bei Bouin-fixierten Organen zu beobachten. Hier stellt sich die Frage, ob es sich um falsch positive Ergebnisse handelt. Möglicherweise binden die zugefügten Nukleotide auch an freie 3‘-Hydroxylgruppen der RNA, die sich im Zytoplasma befindet. Eine weitere Möglichkeit ist die Bindung an mitochondriale DNA. Dies könnte darauf hindeuten, dass in den Zellen mit einer plasmatischen Reaktion ein erhöhter Stoffwechsel stattfindet, wie zum Beispiel bei Differenzierungsprozessen. Dies würde die Gipfel direkt postnatal am ersten Postnataltag und um den 25 bis 30 pnd erklären. Auch Wijsman et al. (1993) konnten plasmatische Reaktionen beobachten und nicht sicher als spezifisch oder artefiziell einordnen. Sie beschrieben bereits eine Reihe von möglichen Ursachen für artefiziell positive Reaktionen, die in der Fixierung und Vorbehandlung der Schnitte begründet sind. Murgia et al. (1992) konnte nachweisen, dass während der Apoptose mitochondriale DNA nicht fragmentiert wird und somit auch keine freien Hydroxylgruppen vorhanden wären, woran die Marker gebunden werden könnten. Tepper und Studzinski konnten dies 2004 bestätigen. Sie fanden heraus, dass bei Nekrosen mitochondriale und nukleäre DNA gleichermaßen abgebaut werden, jedoch nicht bei Apoptosen. Hieraus ergibt sich die Frage, ob nicht eventuell auch nekrotische Zellen angefärbt wurden.

In den Negativkontrollen der einzelnen Fixierungen zeigten sich sehr unterschiedliche Ergebnisse. In Bouin-fixierten Präparaten fanden sich durchweg scheinbar unspezifische plasmatische Anfärbungen der interstitiellen Zellen. In den PLP-fixierten Hoden und den Präparaten, welche mittels Paraformaldehyd fixiert wurden, wiesen die Negativkontrollen ein weitestgehend sauberes Bild

ohne unspezifische Hintergrundfärbungen oder ungewollte scheinbar positive Reaktionen auf.

Interstitiell wurden die Ergebnisse nach Fibroblasten und Makrophagen/Leydig-Zellen getrennt quantifiziert. Nukleäre Reaktionen in Fibroblasten sind fast ausschließlich in Paraformaldehyd-fixierten Präparaten zu beobachten und plasmatische hingegen fast nur in Bouin-fixierten. PLP-Schnitte zeigen keinerlei Reaktion. Auch hier stellt sich die Frage, ob es sich möglicherweise um falsch positive oder auch falsch negative Ergebnisse handeln könnte, die auf den Einflüssen der Fixierung auf die Gewebe beruhen könnten.

Sowohl die nukleären als auch die plasmatischen Reaktionen in Makrophagen und Leydig-Zellen sind ebenfalls fast ausschließlich in Bouin-fixierten Präparaten nachzuweisen.

Auch bei den scheinbar signifikanten positiven Reaktionen in den mitotischen Zellen stellt sich die Frage nach falsch positiven Ergebnissen. Wijsman et al. betrachteten 1993 Zellen mit kondensiertem Chromatin und TUNEL-positiver Reaktion eindeutig als apoptotisch, bemerkten aber auch, dass prinzipiell alle DNA-Brüche dargestellt werden könnten, unabhängig ihrer Ursache. Auch Gobe (2009) sieht die alleinige Darstellung der Apoptose mittels TUNEL als kritisch, obwohl er dies nicht an Hoden, sondern an Nierengewebe untersuchte.

Andererseits könnte es sich auch um Zellen handeln, bei denen innerhalb des Zellteilungsprozesses Fehler aufgetreten sind. Diese Fehler könnten bei Fortführung der Mitose oder ggf. auch Meiose zur Ausbildung von funktionsunfähigen oder fehlfunktionierenden Zellen führen. Sollten solche Fehler im Rahmen von intrazellulären Prüfprozessen erkannt werden, könnten in den betroffenen Zellen apoptotische Abbauprozesse initiiert werden, die die positive Kernreaktion erklären würden, wie auch Yagi et al. (2006) anmerken.

Auffällig ist zudem, dass die scheinbar positiven mitotischen tubulären Zellen sich in allen drei Fixierungen meist in der Meta- oder Prophase befinden und die Häufungen um den 30 pnd liegen. Kon (2005) wies nach, dass es in der Metaphase

eine „metaphase specific apoptosis“ in meiotischen Spermatozyten gibt. Dies entspricht dem Zeitpunkt der Geschlechtsreife bei Ratten, so dass die beginnende Spermatogenese möglicherweise mit einer höheren Rate an Fehlbildungen einhergeht. Es ist denkbar, dass es im Rahmen von intrazellulären Prüfprozessen bei der Zellteilung zu einer Arretierung des Zellzyklus kommt, weil irreparable Schäden aufgetreten sind und die veränderten Zellen aussortiert werden müssen. So könnte zum Beispiel über p53 die Apoptose eingeleitet werden. Vaseva et al. (2012) konnten diesen Vorgang nachweisen. Weiterhin ist es möglich, dass fehlfunktionierende und funktionsuntüchtige Spermatocyten erst zu diesem Zeitpunkt auffallen und eliminiert werden. Ein weiterer Aspekt ist, dass es post-mortem im Rattenhoden zu einer Verklumpung des Chromatins in Leydig Zellen kommt. Bryant et Boekelheide (2007) zeigten in Untersuchungen an Rattenhoden, die post-mortem 12, 24, 36 und 48 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurden, dass bereits nach 12 Stunden eine signifikante Kondensation zu beobachten war. Dies betraf nicht nur das Chromatin in Leydig Zellen, sondern konnte auch in den Sertoli-Zellen und den Spermatogonien nachgewiesen werden. Es bleibt jedoch offen wann dieser Prozess eintritt, möglicherweise auch schon deutlich früher.

4.3 Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse führen zu folgenden Schlussfolgerungen:

1. Die TUNEL-Methode sollte nicht als einzige Methode oder als Hauptmethode zum Nachweis der Apoptose in morphologischen Untersuchungen des Testis‘ verwendet werden. Die Anwendung der TUNEL-Methode kann als ergänzendes Nachweisverfahren in Betracht gezogen werden.

2. Die Auswahl der Fixierungsmethode ist maßgebend für die Befunderhebung. Dies bedeutet auch, dass die Befunde aus einer Studie

nicht auf eine andere Studie übertragen werden können. Dieser Aspekt kann die Anwendbarkeit der TUNEL-Methode erheblich einschränken.

3. Der gemeinsame Befund in allen drei Fixierungen über die Anzahl der nukleären Reaktionen in den Zellen der Tubuli seminiferi zwischen dem 15. und 35. Postnataltag deutet auf eine gesteigerte Apoptose dieser Zellen in der postnatalen Phase hin. Darüber hinaus erlauben die Befunde keine weitere Feststellung zur altersabhängigen Änderung im Apoptoseverhalten der testikulären Zellen.

4.4 Ausblick

1. Zur Verbesserung der Spezifität der TUNEL-Methode sollten vergleichbare Untersuchungen an anderen Geweben mit gesicherten Kenntnissen der proliferativen und apoptotischen Abläufe durchgeführt werden.

2. Zudem sollten vergleichende Kontrollversuche mit anderen, die Apoptose nachweisenden Markern/Methoden, evtl. auch in Kombination mit TUNEL, erfolgen.

3. Weiterhin wären Versuche in Kombination mit anderen Färbungen, die die nukleären Strukturen besser darstellen (zum Beispiel Hämalaun von Giessen) durchzuführen.

4. Auch in Versuchen mit anderen Fixierungsmethoden können Spezifität und Sensitivität gesteigert werden.

5. Zur weiteren Optimierung der Ergebnisse sollten Kontrolluntersuchung mit einer Modifizierung der TUNEL-Methode mit Dampfgarer statt Mikrowelle oder Vorbehandlung in einer feuchten Kammer, wie vom Hersteller im Beipackzettel ergänzend als Alternativen angegeben, erfolgen.

6. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei den TUNEL-positiven mitotischen Zellen wirklich um apoptotische Zellen handelt oder ob es falsch positive Ergebnisse sind. Hierfür wären Untersuchungen notwendig, die sowohl die Apoptose als auch proliferative Vorgänge darstellen, ähnlich wie D'Andrea et al. dies bereits 2010 im Rahmen von toxischen Untersuchungen durchführten bzw. in Anlehnung an die Untersuchungen von Perry et al. (1997), die dem zeitgleichen Nachweis von Apoptose und Nekrose nachgingen.

7. Weiterhin ist unklar, ob es sich bei den plasmatisch positiven Reaktionen möglicherweise um mitochondriale DNA handelt. Grundsätzlich muss die Aussage kritisch überprüft werden, ob die Darstellung der DNA-Fragmente gleichzeitig die Darstellung der Apoptose bedeutet.

5. Literaturangaben

Ariyaratne H. B. S., Mendis-Handagama S. M. L. C., Buchanan Hales D., Mason J. I., (2000): ***Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis.*** Biology of Reproduction, 63: 165 – 171.

Assinder S., Davis R., Fenwick M. and Glover A., (2007): ***Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells***. Reproduction, 133: 11 – 19.

Barth M., Oulmi Y., Ehrenreich H., Schilling L., (2002): ***Pre-embedding immunogold labeling of TUNEL stain enables evaluation of DNA strand breaks and ultrastructural alterations in individual cells of neuronal tissue***. Acta Neuropathol, 104: 621 – 636.

Blottner S., Roelants H., Wagener A., Wenzel U. D., (1999): ***Testicular mitosis, meiosis and apoptosis in mink (Mustela vison) during breeding and non-breeding seasons***. Anim Reprod. Sci. 57 (3 – 4): 237 – 249.

Bryant B. H., Boekelheide K., (2007): ***Time-dependent changes in post-mortem testis histopathology in the rat***. Toxicol Pathol, 35: 665 – 671.

Bustamente-Marin X., Quiroga C., Lavandero S., Reyes J. G., Moreno R. D., (2012): ***Apotosis, necrosis and autophagy are influenced by metabolic energy sources in cultered rat spermatocytes.*** Apotosis, 17: 539 - 550.

Celik O., Kutlu O., Tekcan M., Celik- Ozenci C. Koksal I., (2013): ***Role of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the pathogenesis of varicocele-induced testicular dysfunction***. Asian J Androl., 15: 269 – 274.

Csizmadia E., Csizmadia V., (2009): ***Detection of apoptosis in tissue section.*** Apoptosis, methods in Molecular Biology, 559: 49 – 63.

D'Andrea M. R., Alicknavitch M., Nagele R. G., Damiano B. P., (2010): ***Simultaneous PCNA and TUNEL labeling for testicular toxicity evaluation suggests that detection of apoptosis may be more sensitive than proliferation***. Biotech Histochem, 85 (3): 195 – 204.

Daniel P. T., Wieder T., Sturm I., (2001): ***The kiss of death: Promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy.*** Leukemia, 15: 1022 - 1032.

Daniel P. T., Ganten, Ruckpaul. (2003): ***Zellzyklus und Apoptose.*** **in*: Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien.*** Heidelberg: Springer-Verlag, 130 - 174.

Del Bravo J., Catizone A., Ricci G., Galdieri M., (2007): ***Hepatocyte growth factor-modulated rat leydig cell functions***. J Androl, 28 (6): 866 – 874.

Donehower L.A. and Bradley A., (1993): ***The tumor suppressor p53***. Biochem Biophys Acta, 1155: 181 - 205.

Dorandeu A., Lorin de la Grandmaison G., (2013): ***Contribution of the TUNEL method post-mortem interval estimation: an experimental study***. Ann Pathol., 33: 80 – 83.

Dutta D., Park I., Mills N. C., (2012): ***Fixation temperature affects DNA integrity in the testis as measured by the TUNEL assay***. Toxicol Pathol, 40: 667 – 674.

Emerson L. L., Tripp S. R., Baird B. C., Layfield L. J., Rohr L. R., (2006): ***A comparison of immunohistochemical stain quality in conventional and rapid microwave processed tissues***. Am. J. Clin. Pathol., 125: 176 - 183.

Erkkila K., Kyttanen S., Wikstrom M., Taari K., Hikim A. P. S., Swerdloff R. S., Dunkel L., (2006): ***Regulation of human male germ cell death by modulators of ATP production***. American Journal Physiol Endocrinol Metab., 290: 1145 - 1154.

Erkkilä K., Suomalainen L., Wikström M., Parvinen M., Dunkel L., (2003): ***Chemical anoxia delays germ cell apoptosis in the human testis***. Biology of Reproduction, 69: 617 – 626.

Feirabend H. K., Ploeger S., (1991): ***Microwave applications in classical staining methods in formalin-fixed human brain tissue: a comparison between heating with microwave and conventional ovens***. Eur J Morphol , 29: 185 – 197.

Frankfurt O. S., (2004): ***Immunoassay for single-stranded DNA in apoptotic cells.*** Methods Mol. Biol., 282: 85 – 101.

Frankfurt O. S., Krishan A., (2001): ***Identification of apoptotic cells by formamide induced DNA denaturation in condensed chromatin***. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 49: 369 – 378.

Furtwangler J. A., Hall S. H., Koskinen - Moffett K., (1985): ***Sutural morphogenesis in the mouse calvaria: the role of apoptosis***. Acta Anat Basel, 124: 74 - 80.

Gao H. B., Tong M. H., Hu Y. Q., You Q. S., Ge R. S., Hardy M. P., (2003): ***Mechanism of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis***. Mol Cell Endocrinol, 199: 153-163.

Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A., (1992): ***Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation***. Journal of Cell Biology, 19: 493 – 501.

Gobe G., (2009): ***Identification of apoptosis in kidney tissue sections***. Methods Mol Biol, 466: 175 – 192.

Golstein P., Ojcius D. M., Young J. D., (1991): ***Cell death mechanisms and the immune system***. Immunol Rev, 121: 29-65.

Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R.(1995): ***In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note.*** Hepatology, 21(5):1465 - 8.

Haider S. G., Urban A., Hilscher B., Hilscher W., Passia D. (1983): ***Cyproterone acetate induced changes in the behaviour of hydroxysteroid dehydrogenases in rat Leydig cells during perinatal development***. Andrologia, 15**:** 498 - 506.

Haider S. G., Laue D., Schwochau G., Hilscher B. (1995): ***Morpholgical studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat testis.*** Ital. J. Anat. Embryol. 100 Suppl 1: 535 – 541.

Haider S. G., Passia D., Overmeyer G. (1986): ***Studies on fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3β-hydroxysteroid dehydrogenase activity***. Acta Histochem, 32**:** 197 - 202.

Haider S. G. (2004): ***Cell biology of Leydig cells in the testis***. Int. Rev. Cytology, 233**:** 181 - 241.

Hayashida K., Kohno S., (2009): ***Hybrid male sterility is caused by mitochondrial DNA deletion****.* Mol. Biol. Rep, 36: 1365 – 1369.

Hess R. A., (1990): ***Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes****.* Biology of Reproduction, 43: 525 – 542.

Hikim A. P., Lue Y., Yamamoto C. M., Vera Y., Rodriguez S., Yen P. H., Soeng K., Wang C., Swerdloff R. S., (2003): ***Key apoptotic pathways for heat-induces programmed germ cell death in the testis****.* Endocrinology, 144(7): 3167 – 3175.

Hikim A.P., Lue Y., Diaz-Romero M., Yen P. H., Wang C., Swerdloff R. S., (2003): ***Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis****.* J. Steroid Biochem Mol Biol., 85: 175 – 182.

Hikim A. P., Swerdloff R. S., (1999): ***Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis****.* Reviews of Reproduction, 4: 38 – 47.

Howroyd P., Hoyle-Thacker R., Lyght O., Williams D. and Kleymenova E., (2005): ***Morphology of the fetal rat testis preserved in different fixatives****.* Toxicol Pathol*,* 33: 300 - 304.

Itoh N., Nagata S., (1993): ***A novel protein domain required for apoptosis mutational analysis of human Fas antigen****.* J Biol. Chem., 268: 10932 – 10937.

Jürgensmeier J. M., Xie Z. H., Deveraux Q., (1998): ***Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria****.* Proc Nat., 95: 4997-5002.

Kelly K. J., Sandoval R. M., Dunn K. W., Molitoris B. A., Dagher P. C., (2002): ***A novel method to determine specifity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis***. Am J Physiol Cell Physiol, 284: 1309 – 1318.

Kerr J. B., Knell C. M. (1988): ***The fate of fetal Ley dig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis.*** Development, 103: 535 - 544.

Kim J. M., Luo L., Zirkin B. R., (2000): ***Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate***. Endocrinology, 141: 1846 – 1853.

Kiyozuka Y., Akamatsu T., Singh Y., Ichiyoshi H., Senzaki H., Tsubura A., (1999): ***Optimal prefixation of cells to demonstrate apoptosis by the TUNEL method***. Acta Cytol, 43: 393 – 399.

Kon Y., (2005): ***Morphogenetic investigation of metaphase-specific cell death in meiotic spermatocytes in mice***. Anatomical science international, 80: 141-152.

Kroemer G. J., Reed C., (2000): ***Mitochondrial control of cell death***. Nat Med, 6: 523 - 519.

Labat-Moleur F., Guillermet C., Lorimier P., Robert C., Lantuejoul S., Brambilla E., Negoescu A., (1998): ***TUNEL Apoptotic cell detection in tissue sections: critical Evaluation and Improvement***. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 46: 327- 334.

Latendresse J. R., Warbrittion A. R., Jonassen H., Creasy D. M., (2002): ***Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's Fluid: comparison with Bouin's Fluid and conventional Davidson's Fluid***. Toxicologic Pathology, 30(4): 524 – 533.

Lauber K., Bohn E., Kröber S. M., (2003): ***Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of lipid attraction signal***. Cell, 113: 717-730.

Lee J., Richburg J. H., Younkin S. C., Boekelheide K., (1997): ***The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis***. Endocrinology, 138: 2081 - 3199.

Leonard J. B., Shepardson S. P., (1994): ***A comparison of heating modes in rapid fixation techniques for electron microscopy***. J Histochem Cytochem, 42: 383 - 391.

Li L., Hu B. ,Chen C., Gong S., Yu Y., Dai H., Yan J., (2013): ***Role of mitochondrial damage during cardiac apoptosis in septic rats***. Chin Med J, 126: 1860 – 1866.

Loo D. T., (2011): ***In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques***. Methods in Molecular Biology, 682: 3 – 13.

Login G. R., Dvorak A. M., (1994): ***Methods of microwave fixation for microscopy. A review of research and clinical applicatons: 1970 – 1992.*** Prog Histochem Cytochem, 27: 1 – 127.

Lüllmann-Rauch R. (2006): ***Taschenbuch Histologie***, 2. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, S. 85 ff.

Christina M., Angelika H. L., Bernd P., Martina P (2006): ***Simultaneous detection of a cell surface antigen and apoptosis by microwave sensitized TUNEL assay on paraffin sections***. , J Immunol. Methods, 316: 163 – 166.

Malmi R., Söderström K. O., (1988): ***Lectin binding to rat spermatogenic cells:effects of different fixation methods and proteolytic enzyme treatment***. Histochem J., 276-282.

McDonnell T. J., Beham A., Sarkiss M., Andersen M. M., Lo P., (1996): ***Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation***. Experientia, 52: 1008-1017.

Mekota A. M., Vermehren M., (2005): ***Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistochemical analysis of mummified soft tissues***. Biotech Histochem, 80: 7 – 13.

Mendis-Handagama S. M. L. C., Ariyaratne H. B. S., (2001): ***Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis***. Biology of reproduction, 65: 660 – 671.

Migheli A., Attanasio A., Lee W. H., Bayer S. A., Ghetti B. (1995): ***Detection of apoptosis in weaver cerebellum by electron microscopic in situ end-labeling of fragmented DNA***. Neurosci Lett. 199(1): 53 - 6.

Morales A., Mohamed F., Cavicchia J.C., (2007): ***Apoptosis and blood-testis barrier during the first spermatogenic wave in the pubertal rat***. The anatomical record, 290: 206 – 214.

Mulisch M., Welsch U., (2010): ***Romeis – mikroskopische Technik***. 18. Auflage, Spektrum Verlag.

Murgia M., Pizzo P., Sandoná D., Zanovello P., Rizzuto R., Di Virgilio F., J, (1992): ***Mitochondrial DNA is not fragmented during apoptosis***. Biol Chem, 267: 10939 – 10941.

Nagata S., Golstein P., (1995): ***The Fas death factor***. Science, 267: 1449 - 1456.

Negoescu A., Lorimier P., Labat-Moleur F., Drouet C., Robert C., Guillermet C., Brambilla C., Brambilla E., (1996): ***In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations***. J Histochem Cytochem., 44: 959 – 968.

Negoescu A., Guillermet C., Lorimier P., Brambilla E., Labat-Moleur F., (1998): ***Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specific***. Biomed. Pharmacother, 52: 252 – 258.

Nishizaki K., Yoshino T., Orita Y., Nomiya S., Masuda Y., (1999): ***TUNEL staining of inner ear structures may reflect autolysis, not apoptosis***. Hear Res., 130: 131- 136.

Noyan S., Kahveci Z., Cavusoglu I., Minbay F. Z., Sunay F. B., Sirmali S.A.,(2000): ***Effects of microwave irradiation and chemical fixation on the localization of perisinusoidal cells in rat liver by gold impregnation***. J Microsc, 197: 101 – 106.

Olaso R., Pairault C., Boulogne B., Durand P., Habert R., (1998): ***Transforming growth factor ß1 and ß2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis***. Endocrinology 139: 733 – 740.

Ozawa N., Goda N., Makino N., Yamaguchi T., Yoshimura Y., Suematsu M., (2002): ***Leydig cell–derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress***. J. Clin. Invest., 109: 457–467.

Pentikainen V., Erkkila K., Dunkel L., (1999): ***Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro***. Am J Physiol Endocrinol Metab, 276: 310 – 316.

Perry S. W., Epstein L. G., Gelbard H. A., (1997): ***Simultaneous in situ detection of apoptosis in monolayer cultures by TUNEL and trypan blue staining***. Biotechniques, 22: 1102 – 1106.

Popvska S., van Dierendonck J. H., Baichev G. Deliiski T., (1999): ***The TUNEL technic for demonstrating apoptosis on paraffin sections***. Akush Ginekol(Sofiia), 38: 37 – 39.

Reith A., Kraemer M., Vassy J., (1984): ***The influence of mode of fixation, type of fixative and vehicles on the same rat liver: a morphometric/stereologic study by light and electron microscopy.*** Scan Electron Microsc., 645 – 651.

Ricci G., Guglielmo M. C., Caruso M., Ferranti F., Canipari R., Galdieri M., Catizone A., (2012): ***Hepatocyte growth factor is a mouse fetal Leydig cell terminal differentiation factor.*** Biol Reprod. ,87(6): 146 1 – 11.

Rodriguez I., Ody C., Araki K., Garcia I., Vassalli P., (1997): ***An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis.*** The EMBO Journal, 16: 2262 – 2270.

De Rooij D. G., (2001): ***Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells***. Reproduction, 121: 347 – 354.

Rotter V., Schwartz D., Almon E., Goldfinger N., Kapon A., Meshorer A., Donehower L. A., Levine A. J., (1993): ***Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerativesyndrome***. Proc Natl Acad Sci, 90: 9075 – 9079.

Rudner J., Jendrossek V., Belka C., (2002): ***New insights in the role of Bcl-2 Bcl-2 and the endoplasmatic reticulum***. Apoptosis, 7: 441 - 447.

Russel L. D., Chiarini-Garcia H., Korsmeyer S. J., Knudson C. M., (2002): ***Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis***. Biology of Reproduction, 66: 950 – 958.

Ruwanpura S. M., McLachlan R. I., Stanton P. G., Meachem S. J., (2008): ***Follicle-stimulating hormone affects spermatogonial survival by regulating the intrinsic apoptotic pathway in adult rats***. Biology of Reproduction, 78: 705 – 713.

Ruwanpura S. M., McLachlan R. I., Stanton P. G., Loveland K. L., Meachem S. J., (2008): ***Pathways involved in testicular germ cell apoptosis in immature rats after FSH suppression***. Journal of Endocrinology, 197: 35 - 43.

Salvesen G. S., Duckett C. S., (2002): ***IAP proteins: blocking the road to death´s door***. NAT Rev Mol Cell Biol., 3: 401 – 410.

Sánchez M. A., Díaz N. L., Tapia F. J., (2002): ***Microwave irradiation for rapid epidermis-dermisseparation and improved epidermal cell immunodetection***. Biotechnic & Histochemistry, 77: 183 – 187.

Saraste A., (2007)*:* ***Morphologic criteria and detection of apoptosis***. Herz, 3: 189 – 195.

Sasso -Cerri E., Miraglia S. M., (2002): ***In situ demonstration of both TUNEL-labeled germ cell and Sertoli cell in the cimetidine-treates rats.*** Histology and Histopathology, 17: 411 – 417.

Sekoni V. O., Gustafsson B. K., Mather E. C., (1981): ***Influence of wet fixation, staining techniques, and storage time on bull sperm morphology***. Nord Vet Med., 33 (4-5): 161 -166.

Simoes V. L., Alves M. G., Martins A. D., Dias T. R., Rato L., Socorro S., Oliveira P. F., (2013): ***Regulation of apoptotis signaling pathways by 5-Alpha-dihydrotestosterone an 17ß-estradiol in immature rat Sertoli cells***. J. Steroid Biochem. Mol Biol, 135: 15 – 23.

N.Sofikitis, E.Pappas, A.Kawatani, D.Baltogiannis, D.Loutradis, N.Kanakas, D.Giannakis, F.Dimitriadis, K.Tsoukanelis, I.Georgiou, G.Makrydimas, Y.Mio, V.Tarlatzis, M.Melekos, I.Miyagawa, (2005): ***Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment.*** Human Reproduction Update, 11(3): 229 – 259.

Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S., (2002): ***Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids***. Am. J. of Pathology, 161 (6): 1961 – 1971.

Srinivasula S. M., Hegde R., Saleh A., Datta P., Shiozaki E., Chai J., Lee R.-A., Robbins P. D., Fernandes-Alnemri T., Shi Y., Alnemri E. S., (2001). ***A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis***. Nature, 410: 112 – 116.

Stähelin B. J., Marti U., Solioz M., Zimmermann H., Reichen J., (1998): ***False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate***. J Clin Pathol: Mol Pathol, 51: 204 – 208.

Strasser A., O'Connor L., Dixit V. M., (2000): ***Apoptosis signaling***. Annu Rev Biochem, 69: 217 – 245.

Sukhotnik I., Nativ O., Roitburt A., Bejar D., Coran A. G., Mogilner J. G., Nativ O. (2013): ***Methotrexate induces germ cell apoptosis and impairs spermatogenesis in a rat***. Pediatr. Surg Int., 29 (2): 179 – 184.

Suter L., Koch E., Bechter R., Bobadilla M., (1997): ***Three-Parameter flow cytometric analysis of rat spermatogenesis*.** Cytometry, 27: 161 – 168.

Suzuki Y., Imada T., Yamaguchi I., Yoshitake H., Sanada H., Kashiwagi T., Takaba K., (2012): ***Effects of prolonged water washing of tissue samples fixed in formalin on histological staining***. Biotech Histochem, 87: 241 - 248.

Sweeney S. T., Hidalgo A., de Belle J. S., Keshishian H., (2012): ***TUNEL-antibody double-labeling method for Drosophila embryos***. Cold Spring Harb Protoc, 9: 1013 – 1019.

Takahashi R., Deveraux Q., Tamm I., Welsh K., Assa-Munt N., Salvesen G. S., Reed J. C., (1998): ***A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases***. J Biol Chem, 273 (14): 7787 – 7790.

Tateyama H., Tada T., Hattori H. Murase T., Li W. X., Eimoto T., (1998): ***Effects of prefixation and fixation times on apoptosis detection by in situ end-labeling of fragmented DNA***. Arch Pathol Lab Med, 122: 252 – 255.

Tamura T., Said S., Lu W., Neufeld D., (2000): ***Specificity of TUNEL method depends on duration of fixation***. Biotech Histochem., 75: 197 – 200.

Tartaglia L. A., Ayres T. M., Wong G. H. W., Goeddel D. V., (1993): ***A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death***. Cell, 74: 845 – 853.

Tepper C. G., Studzinski G. P., (2004): ***Resistance of mitochondrial DNA to degradation characterizes the apoptotic but not the necrotic mode of human leukemia cell death***. J Cell Biochem, 52 (3): 352 – 361.

Tu L., Yu L., Zhang H., (2011): ***Morphology of rat testis preserved in three different fixatives***. J Huanzhong Univ. Sci Technol, 31: 178 – 180.

Van der Steen A. F., Thijssen J. M., Ebben G. P., de Wilde P. C., (1992): ***Effects of tissue processing techniques in acoustical (1.2 GHz) and light microscopy***. Histochemistry, 2: 195 - 199.

Vaseva A. V., Marchenko N. D., Ji K., Tsirka S. E., Holzmann S., Moll U. M., (2012): ***p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis***. Cell, 149 (7): 1536 – 1548.

Vera Y., Diaz-Romero M., Rodriguez S., Lue Y., Wang C., Swerdloff R. S., Hikim A. P. S., (2004): ***Mitochondria-dependent pathway is involved in heat-induced male germ cell death: Lessons from mutant mice***. Biology of Reproduction, 70: 1534 – 1540.

Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J., Vaux D. L., (2000): ***Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.*** Cell, 102: 43 – 53.

Vries E. G. E., Gietema J. A., deJong S., (2006): ***Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand Pathway and Its Therapeutic Implications.*** Clin Cancer Res, 12 (8): 2390 – 2393.

Watanabe T., Ebara S., Kumura S., Maeda K., Watanabe Y., Watanabe H., Kasai S., Nakano Y., (2007): ***Maternal vitamin B12 deficiency affects spermatogenesis at the embryonic and immature stages in rats.*** Congenital Anomalies, 47: 9 – 15.

Wijsman J. H., Jonker R. R., Keijzer R., van de Velde C. J., Cornelisse C. J., van Dierendonck J. H., (1993): ***A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labelling of fragmented DNA***. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 41: 7 – 12.

Woolveridge I., de Boer B. M., Taylor M. F., Teerds K. J., Wu F. C., Morris I. D., (1999): ***Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis related genes***. Biol Reprod, 60: 461 - 447.

Yagi M., Suzuki K., Suzuki H., (2006): ***Apoptotic Sertoli cell death in hypogonadic (hgn/hgn) rat testes during early postnatal development.*** Asian Journal of Andrology, 5: 535 – 541.

Yang, J., Liu, X., Bhalla K., (1997): ***Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked.*** Science, 275: 1129 – 1132.

Yao B., Yi N., Zhou S., OuYang W., Xu H., Ge Y., Cui Y., Xia X., (2012): ***The effect of induced anti-follicle-stimulationg hormone autoantibody on serum hormone level and apoptosis in rat testis***. Life Sci., 91 (3 -4): 83 – 88.

Young K. A., Nelson R. J., (2001): ***Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis.*** Reproduction, 122: 677 – 685.

Young K. A., Zirkin B. R., Nelson R. J., (2001): ***Testicular apoptosis is down-regulated during spontaneous recrudescence in white-footed mice (Peromyscus leucopus).*** J Biol Rhythms, 16 (5): 479 – 488.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. S. G. Haider danke ich für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und die überaus hervorragende Betreuung.

Frau G. Berthold danke ich für die gute und fruchtbare technische Hilfe.

Mein Dank gilt auch Frau G. Servos für ihre Unterstützung bei der fotographischen Dokumentation.

Meinen Eltern und meinem Freund danke ich für ihre geduldige und unermüdliche Begleitung.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Dezember 2013

Anja Miedlich

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Anja Miedlich
Geburtsdatum:	16. Mai 1981
Geburtsort:	Grimma

Schulbildung:

1987 - 1992	POS Beucha
1992 - 1999	Gymnasium Brandis Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

08/1999 - 06/2002	Ausbildung zur Hotelfachfrau Swissôtel Düsseldorf / Neuss Rheinallee 1 41460 Neuss

Berufstätigkeit:

07/2002 - 09/2003	Empfangsassistentin Hilton Hotel Düsseldorf Georg - Glock - Strasse 20 40474 Düsseldorf

Hochschulausbildung:

10/2003 – 06/2010	Studium der Humanmedizin
03/2006	1. Staatsexamen (nach neuer ÄAppO)
05/2010	2. Staatsexamen (nach neuer ÄAppO)

Famulaturen:

03/2007	Dr. med. Betzold, Diabetologische Schwerpunktpraxis, Neuss
08/2007	PD Dr. med. Schmid Radiologie, Johanna-Etienne-Krankenhaus Neuss
03/2008	Dr. med. Ploenes Angiologie, Dominikus-Krankenhaus,

	Düsseldorf
08/2008	Prof. Dr. med. Hartung Neurologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
09/2008	Dr. med. Mohr Neurologie, Johanna-Etienne-Krankenhaus, Neuss

Praktisches Jahr:

02/2009 - 06/2009	Prof. Dr. med. Besser, Neurologie, Klinikum Krefeld
06/2009 - 08/2009	PD Dr. med. Wullstein, Allgemein- und Viszeralchirurgie, Klinikum Krefeld
08/2009 - 09/2009	PD Dr. Kraft, Orthopädie- und Unfallchirurgie, Klinikum Krefeld
10/2009 - 01/2010	Innere Medizin, Klinikum Krefeld

Ärztliche Tätigkeit:

07/2010 – 06/2014	Assistenzärztin in der Weiterbildung zum Facharzt für Neurologie Helios Klinikum Krefeld Klinik für Neurologie Lutherplatz 40 47805 Krefeld
Seit 07/2014	Assistenzärztin in der Weiterbildung zum Facharzt für Neurologie St. Alexius-/St. Josef-Krankenhaus Nordkanalallee 99 41464 Neuss

Sonstige berufliche Erfahrung:

2007 - 2009	Hilfskraft in diabetologischer Schwerpunktpraxis

Fremdsprachen:	Englisch (Wort und Schrift) Französisch (Grundkenntnisse)
Hobbys:	Reisen Lesen Backen Garten

Anja Miedlich

Dezember 2014